

6.5 Der Tsp-1 Promotor

6.5.1 Die Identifizierung potenzieller scherstressabhängiger Elemente im Bereich des Tsp-1 Promotors

Eine computergestützte Analyse der Tsp-1 Promotorsequenz von Position –2217 bis +754 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt (Abbildung 6.17) durch das Programm MatInspector Release Professional 7.4.4 zeigte eine Vielzahl potenzieller Transkriptionsfaktorbindestellen. Die möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen die bereits im Zusammenhang mit scherstressabhängiger Genregulation beschrieben wurden, sind in der Abbildung 6.17 in rosa dargestellt [Sumpio *et al.*, 1997; Sokabe *et al.*, 2004; Nakatsuka *et al.*, 2006; Dekker *et al.*, 2005; Miyagi *et al.*, 2005). Experimentell identifizierte Elemente [Laherty *et al.*, 1989] sind in schwarz (fett) dargestellt und beinhalten diverse Transkriptionsfaktorbindestellen und Elemente des Kernpromotorbereiches wie TATA und CAAT-Box

```

-2217 CAACTGAAGT ATCATGATAA GAGGAAGGGC TTTGTGTTTG AGATAAGCAG
-2167 CTCCTATACC TGTCAGCTTT CTCTAATAAG AAAGCTCTTT CTTGCCACCG
-2117 TATAGGTCAC CTTCTTATTG GTAAAGCATG ATGAAGTTTG GAAACTGTTG
-2067 TCCTTGTTTT GTTGAAAGAA GCCAAGTTCC AAGAAATCTG CAGAGGCATT
-2017 CCTACAATCC CTCAGCCATG GCAGCATGAA TCCTGAAGGG GCAGTGAGTG
-1967 CTGGTTTCTA CTCTGTCTGC ACAGCTAAGC CTAGGGGAGA TAATCTTTTC
-1917 ATACAAGATG CATTCTGCTT TTGTGGACCT CTTGCAGCCC TCAAGCCCCC
-1867 ATCTGATTG TACACAATGA TCCAGTGGGC CAGAGGAGCC CAGAGCCATG
-1817 AGCGGCCCAT CCCTCCAAGA ACTATTTCTG ACTGTCCAGT ATCATGGAGC
-1767 AA•GTGGAAG AAGAAAAAA AAACCCAATT ACTTTTCGAA GAGCAAGGTG
-1717 AATGCTGTAG AAGGAGAAGG AAGGGGAGGG GAGATGGGAT GGGTGCCGAT
-1667 TCCAGAATCT TCAGATCTGC TTGGATGAAT CATTACCTAT GATTGCGGG
-1617 ACAAGAATCT GATTTTATTC ATCAACCAGT AGAACTTTT CTTTCTGCCT
-1567 CCCAACATCT GAAATCCAAC AAACATGTGC CTTAGGAACA TACCGGTCAT
-1517 CTTTtagagg CATTTTATAT ACATATTGAG TAACTAGAAA AACTCTTTC
-1467 CGTAATACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACCATCTT GTCATACAAC
-1417 ACTCCCACGC AAGAAAAGCG AAAGTGTGTG TTGATGAATG TAAACTTGTG Egr-1 (-)
-1367 GCTGTTTGCA GCAGTCGGGA GTCCTGCCAG GTTTAAGTGC TAAGATGGGA
-1317 GGTGAACCCC AGGGGTTTCC CCCTGCCCGT GCTGAGATCC TTATTGGTC
-1267 AAGCTTCTAC CTATGCCCTG GCCTCGGAGC GAGCCCGATA GCGCTGGATC GATA (+)
-1217 ACAGCAGAGG GAGCGAGGCG GCT⊙TGACGTCC CATCCCGAAG AGATGAATGG
-1167 AATTCCAAGA AGCTAGAGTC ATGCTGGCTT GGGACAGTGG CTTGGAGACC SSRE (+)

```

-1117 AGACTTCAAT GACAGAAGCA CTAGGCAGCG GCACTCATGG CAATGTGTGC
 -1067 ACCCACAGAA ATGTAACCCA CACCTCGGGT TCAGGAGCCG AAAAATGAAA
 -1017 AGAACGTTTA GGGAGGGAAA AGGGAAATAC AATAATAGGC AGAGAGTAAT
 -967 TTATTACTCT ATGGGTCTGC TCTGTAAATA GCTGAAGGCT CTGGAGCCAG
 -917 ATGGTTCTGC AAATTCTCCA AACAGGAGTC ACGTTAAGAA GCACGAGTGG
 -867 GCACAAAAAC TGTTTTTCAA GACACAATTT CAATTTGGCT TGTGAAACT
 -817 GGATACGAGT AAGTTTC CTT AAAATTCGAG TAGAAAGCAG CTGTCCTCCC
 -767 CGGGCCCTT GATGAGAATA CGCACACCG C CCCCAAGCGG CCGGCCGAGG AP-2 (+)
 -717 GAGCGCCGCG GCAGCGGGAG AGGCGTCTCT GTGGGCCCC TGGCAGCCGC hypothetischer
 -667 GGCAGGAAAG GGCCGAAGG CAGCGAAGGC GAACGCGGCG CACCAACCTG offener
 -617 CCGGCCCCCG CGACGCGCG CTCACCTCCC TCC GGGGCGG GCGTGGGGCC Leserahmen
 -567 AGCTCAGGAC AGGCGCTCGG GGGACGCGTG TCCTCACCCC ACGGGGACGG
 -517 TGGAGGAGAG TCAGCGAGGG CCCGAGGGGC AGGTACTTTA ACGAATGGCT
 -467 CTCTTGGTGT CCCCT GCGCC CCGTCGGCCC ATTTTCTTT TTACAAAACG
 -417 GGCCAGTCT CTAGTATCCA CCTCTCGCCA TCAACCAGGC ATTCGGGGAG
 -367 ATCAGCTCGC CGAAAGCCC CT GCGCCACC CCGCGGGCCC TCCTAGGTGG
 -317 TCT CCCCAGC CCGTCCCTT TTCGGGATGC TTGCTGATCA CCCCAGCCCC
 -267 GCGTGCGCA AGAGTACGAG CGCCGAGCCC GTGCGGCCA AGGCTGCGTG
 -217 GCGGGGCACC GACTTTTCTG AGAAGTTCTA GTGCTCCCA GCCCCGACCC
 -167 CCGCCCCCTT CACTTTCTAG CTGGAAAGTT GCGCGCCAGG CAGCGG GGGG
 -117 CGGAGAGAGG AGCCCAGACT GGCCCCACC TCCCGCTTCC TGCCCGGCCG
 -67 CCGCCC ATTG GCCGGAGGAA TCCCCAGGAA TGCGAGCGCC CTTTAAAG
 -17 CCGCGGCTC CTCCGCTTG CAGCGGCTG CGCCGAGCT GGCCTGCGAG 5'- UTR
 +33 TTCAGGGCTC CTGTCGCTCT CCAGGAGCAA CCTCTACTCC GGACGCACAG
 +83 GCATCCCCCG CGCCCTCCA GCCCTCGCG CCCTCGCCAC CGCTCCCGGC
 +133 CGCCGCGCTC CGGTACACAC AGGTAAGTCG CCCCCGGCGG CCGCCGAGGA Egr-1 (-)
 +183 CCAAAGCTGC CCGGGACATC CACCTGGAGC GCTGAGGCTT CAGTCCCTCT IntronI
 +233 GGTGGACCCC GGAACCTACA CTCTCCCGT TCGCCTACCC CAGCCGCTC
 +283 CTCTCAGCCG CTGGAGGACT CTTCAGGGCA AGACTCCAGA GCCATCCTCT
 +333 CCAGCCTTGA GGTTACAAA CCAACTCATC AGGACACCCC AAGATTTCTT
 +383 TACTCTCTGA AGTCCTCCTT AAGCCTTTGT ATCAGCACTC AGGGAAGAGT GATA (-)
 +433 CTGTACTTCC CCTGCCCTCC CTGCAACCCC AACTACAGT TCCTGATCTT
 +483 GCTCACCTTC GACTTCCCA AAGCCCCAA ATTGTTGGTC TTGCGCCCC
 +533 CACACTTTAA AACCAGCATC TCTTTCCTCC ACCTCTCTCT CTCTCTCTCT GAGA-Box (-)
 +583 CTCTCTCTCT CATGCTCTCT GGAAAGTAAT CCTGTTGTCC TTCATTTTCA
 +633 CAAACGCGGG GTCAAAGAGG GATGGTCCG GCCCTGTCC CATGCCCAGC AP-2 (+)
 +683 CCCGTTTCTG CGCACCGTCC CTCCTGCCT AGCTGATCTC TGACCCTCGG
 +733 CTCTTGCTCT TCCTGCTACA GGATC

Abb. 6.17: Tsp-1 Promotorsequenz von der Position –2217 bis +754 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt, mit bisher bekannten Transkriptionsfaktorbindestellen [Laherty *et al.*, 1989]. ○ = TATA-Box; X = CAAT-Box; □ = SP1-Bindestelle; ▲ = AP-2-Bindestelle; ■ = cfos-Direct Repeat; ► = Heat Shock Response Element; ● = Viraler Core-Enhancer; ▣ = cfos-Response Element; ⊕ = cAMP-Bindestelle. Der Transkriptionsstartpunkt ist mit +1 gekennzeichnet. An diesen schließt sich stromabwärts eine 5'-Untranslatierte Region (5'-UTR) an (schwarz fett gedruckt). Das erste Intron des Tsp-1 Gen ist in grau dargestellt. Potentielle scherstressabhängige Transkriptionsfaktor Bindestellen (rosa, doppelt unterstrichen) und ein hypothetischer offener Leserahmen (blau) sind angegeben.

Besonders interessant ist die mögliche Transkriptionsfaktorbindestelle an der Position –1123 des Tsp-1 Promotors. Es handelt sich hierbei um die Sequenz *GAGACC*, welche zunächst von Resnick und Mitarbeitern 1992 im Promotor des PDGF-B Gens entdeckt und als *Shear Stress Response Element* identifiziert wurde. Resnick und Mitarbeiter konnten die Scherstressabhängigkeit des PDGF-B-Gens auf die Sequenz *GAGACC* in dessen Promotor zurückführen. Später [Fisselthaler *et al.*, 2003] wurde die Konsensus-Sequenz zu *ACC(G)/(T)AGACCAG* erweitert. Im Promotorbereich des Tsp-1 Gens befindet sich die Sequenz *TTGGAGACCAG*, die der ursprünglichen durch Resnick beschriebenen Sequenz des SSRE entspricht. Das *Shear Stress Response Element* konnte in vielen Genen, die sensitiv auf Scherstress reagieren, identifiziert werden. Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass diese Sequenz z.B. in den Promotorregionen der Gene TGF-β und MCP-1 zwar vorhanden aber nicht alleine für deren Scherstressabhängigkeit verantwortlich war [Ohno *et al.*, 1995]. TGF-β und MCP-1 zeigten trotz Deletion des SSRE scherstressabhängige Genexpression. Ebenfalls interessant ist, dass sich zwischen der Sequenz des SSRE und dem Transkriptionsstartpunkt des Tsp-1 ein hypothetischer offener Leserahmen befindet, von dem bisher nicht bekannt ist ob er für ein Protein kodiert. Dieser ist in der Abbildung 6.17 in blau dargestellt. Im 5'-Bereich dieses hypothetischen Proteins konnte zwar keine TATA-Box identifiziert werden, trotzdem sollte ausgeschlossen werden, dass hier ein weiteres Protein exprimiert wird, zu dessen Promotorbereich das SSRE gehören könnte.

Um die Scherstressabhängigkeit der Tsp-1 Expression auf Transkriptionsebene zu bestätigen und zu klären, welche möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen hier für eine Regulation verantwortlich sind, wurde die gesamte Promotorregion von –2217 bis +754 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt in ein Promotortestplasmid ohne eigenen Promotor aber mit dem leicht nachweisbaren Reporter gen, der Sezernierten Alkalischen Phosphatase (SEAP), kloniert (pSEAP1-3,0kb, Abschnitt 6.5.2.3). Die Sezernierte Alkalische Phosphatase bietet sich aufgrund ihrer hohen Sensitivität als Reporter gen in Expressionsstudien an. Ein weiterer

Vorteil gerade in Strömungsversuchen ist, dass die SEAP in den Kulturüberstand sezerniert wird. Durch einen Mediumwechsel kann so z.B. das während der statischen Vorkultivierung exprimierte Enzym leicht entfernt werden. Um die unterschiedlichen potenziell scherstress-relevanten Transkriptionsfaktorbindestellen im 5'-Bereich des Tsp-1 Promotors zu untersuchen, wurden Promotortestplasmide mit unterschiedlichen 5'-Deletionen hergestellt (pSEAP-1-1,9kb; pSEAP1-1,8kb; pSEAP1-0,9kb). Um mögliche regulatorische Elemente im ersten Intron und in der 5'-UTR des Tsp-1 Gens zu untersuchen, wurden Promotortestplasmide mit unterschiedlichen 3'-Deletionen des Introns und der 5'-UTR hergestellt (pSEAP1-2,2kb und pSEAP1-2,6kb). Um die Funktion des *Shear Stress Response Elements* auf den Promotor zu untersuchen, wurde ein Promotortestplasmid generiert, das die gesamte Tsp-1 Promotorregion enthielt, dessen SSRE Bindestelle aber mutiert war (pSEAP1-mSSRE). Um auszuschließen, dass das SSRE zu dem Promotorbereich eines anderen, im Tsp-1 Promotor lokalisierten, offenen Leserahmens gehört wurde ein Promotortestplasmid generiert, das nur die ersten 1,4 kb des Tsp-1 Promotors enthielt (pSEAP1-1,4kb). In der Abbildung 6.18 ist eine Übersicht der hergestellten Vektoren gezeigt.

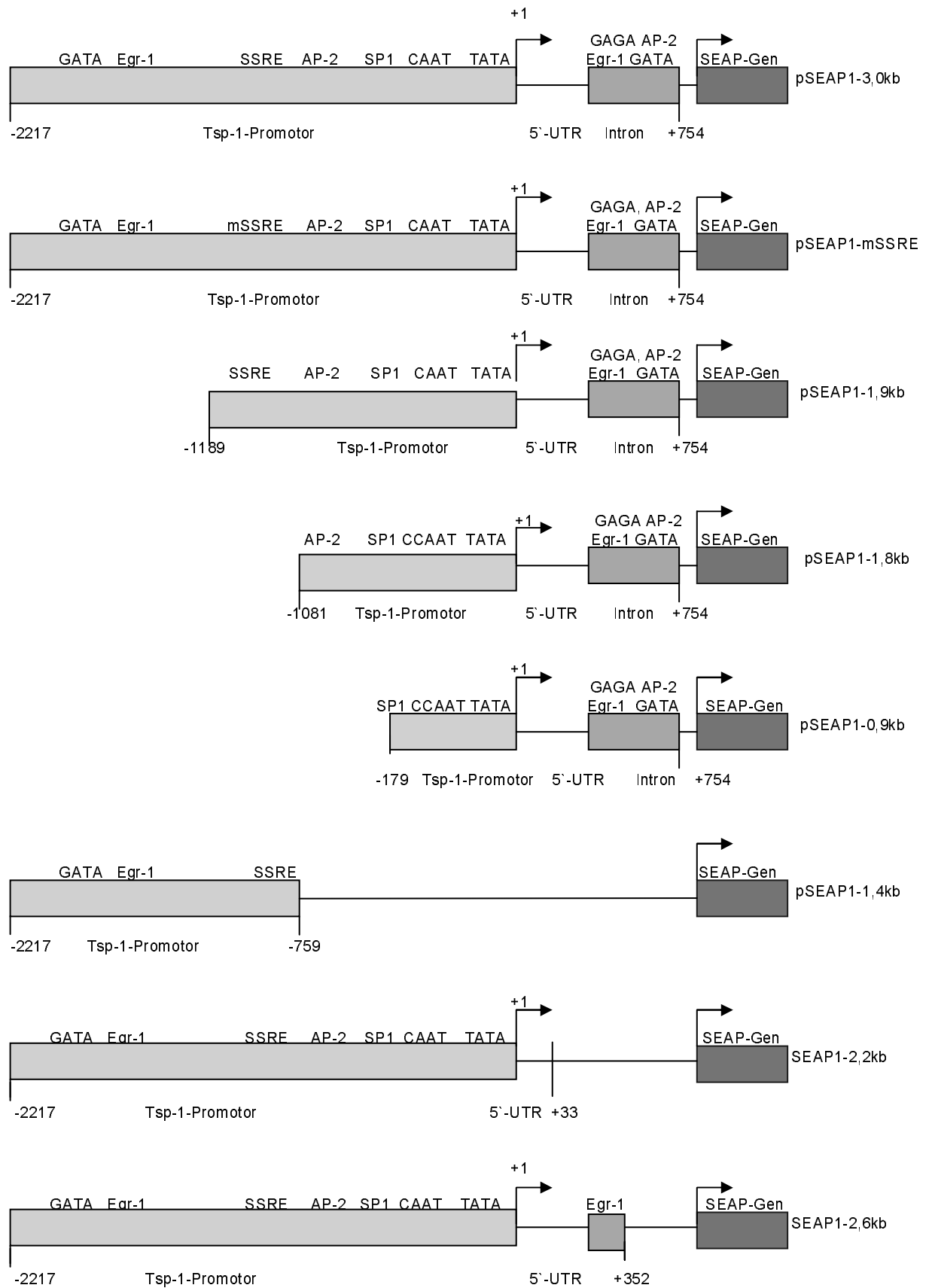


Abb. 6.18: Schematische Darstellung der hergestellten Vektoren. Mit +1 ist der Transkriptionsstart des Tsp-1 Gens gekennzeichnet.

6.5.2 Herstellung der Promotortestplasmide

6.5.2.1 Herstellung des Reportervektors pSEAP1

Kommerziell erhältliche Vektoren, die sich zur Promotoranalyse eignen und die Sekretierte Alkalische Phosphatase als Reportergen enthalten, haben den Nachteil, dass eine Antibiotikumresistenz zur Selektion transfizierter Säugerzellen fehlt. Die Selektion transfizierter Zellen soll aber nach der Transfektion möglich sein, um stabile Expressionszelllinien zu erhalten. Deshalb wurde zunächst der Basisvektor pSEAP1 zur Herstellung der unterschiedlichen Promotortestplasmide generiert. Als Grundgerüst des Vektors pSEAP1 wurde der Vektor pEGFP1 verwendet (Abschnitt 4.14.2). Diesem fehlen eukaryotische Promotor- und Enhancer-Elemente. Er enthält allerdings ein Neomycin-Resistenzgen zur Selektion transfizierter Säugerzellen. Als Reportergen enthält der Vektor pEGFP1 eine rotverschobene Variante des Grün Fluoreszierenden Proteins hinter einer Polylinkerregion in die die unterschiedlichen Promotorfragmente inkloniert werden sollten. Zunächst wurde das Grün Fluoreszierende Protein aus dem Vektor pEGFP1 mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen AgeI und NotI entfernt, um das SEAP-Gen über kompatible Enden an die Stelle des EGFP zu inserieren. Die Sequenz der SEAP wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Abschnitt 5.3.13) und spezifischen Primern, die über ihre 5'-Enden die passenden Restriktionsschnittstellen AgeI (Forward-Primer) und NotI (Reverse-Primer) einbrachten, aus dem Vektor pSBC-2 (Abschnitt 4.14.4) amplifiziert. Der Vektor pSBC-2 wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. Dirks (DSMZ) zur Verfügung gestellt.

6 µg pEGFP1 wurden mit den Enzymen AgeI und NotI, wie unter Abschnitt 5.3.9 beschrieben, inkubiert und die 5'-Enden dephosphoryliert (Abschnitt 5.3.10). Die Enzyme wurden durch Inkubation für 20 min bei 80 °C hitzeinaktiviert und 2 µl des Restriktionsansatzes wurde in einem 1 %igen Agarosegel getrennt und hinsichtlich Größe und Qualität analysiert (Abbildung 6.19).

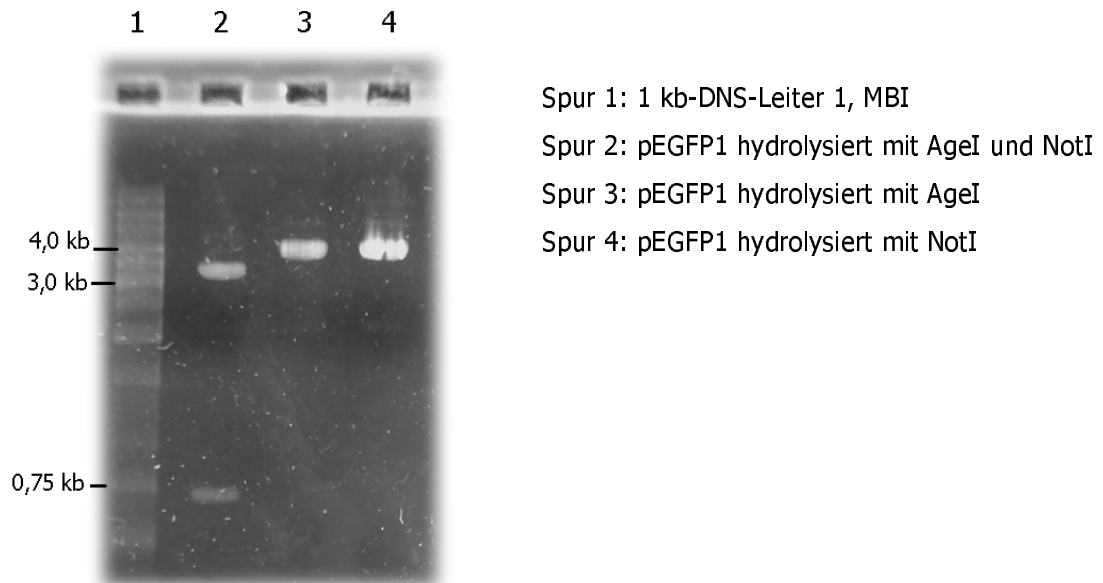
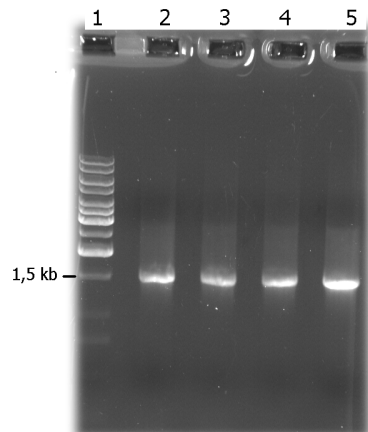


Abb. 6.19: 1 %iges Agarosegel der Hydrolyse von pEGFP1 mit den Restriktionsendonukleasen AgeI und NotI.

Die Hydrolyse des Plasmids pEGFP1 zeigte Fragmente der erwarteten Größen von 0,7 kb und 3,4 kb. Die Kontrollrestriktionen mit jeweils einer der beiden eingesetzten Restriktionsendonukleasen AgeI bzw. NotI zeigten eine Linearisierung des Vektors mit einer Größe von 4,1 kb. Die DNS-Fragmente des Restriktionsansatzes mit den Enzymen AgeI und NotI wurde mit Hilfe des PCR-Purification Kits gereinigt (Abschnitt 5.3.8.1) und in 50 µl EB-Puffer eluiert. Die erhaltene Konzentration wurde spektralphotometrisch (Abschnitt 5.3.7) bestimmt und lag bei 34 ng/µl. Auf eine Trennung des linearisierten Vektors und des EGFP-Fragmentes durch Gelextraktion wurde verzichtet, da die Dephosphorylierung der 5` Enden eine Religation des EGFP in den Vektor verhindert. Die Probe wurde bis zum Einsatz in der Ligationsreaktion bei -20 °C gelagert.

Das SEAP-Gen befand sich in der Polylinkerregion des Vektors pSBC-2 (Abschnitt 4.14.4) zwischen den Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII. Da eine Klonierung über passende Restriktionsschnittstellen nicht möglich war, wurde die SEAP-Sequenz mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert, wobei die passenden Erkennungssequenzen der Restriktionsschnittstellen AgeI und NotI über die 5`-Enden der verwendeten Oligonukleotide an die Sequenz der SEAP angefügt wurden. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter Abschnitt 4.12 dargestellt.

Vier PCR-Reaktionen wurden wie unter Abschnitt 5.3.13.1 pipettiert und in einem Thermocycler amplifiziert. In einem 1 %igen Agarosegel wurden 7 µl der PCR-Ansätze getrennt und hinsichtlich Größe und Qualität analysiert (Abbildung 6.20).



Spur 1: 1 kb DNS Leiter 1, MBI

Spur 2: PCR-Ansatz (1) zur Amplifikation der SEAP

Spur 3: PCR-Ansatz (2) zur Amplifikation der SEAP

Spur 4: PCR-Ansatz (3) zur Amplifikation der SEAP

Spur 5: PCR-Ansatz (4) zur Amplifikation der SEAP

Abb. 6.20: 1 %iges Agarosegel mit den PCR-Ansätze 1-4 zur Amplifikation der SEAP aus dem Plasmid pSBC-2. In allen 4 Spuren war eine Bande bei einer Größe von 1,5 kb als Produkt der PCR-Reaktion zu erkennen.

Alle 4 Ansätze enthielten ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe des SEAP-Gens von 1521 bp. Die PCR-Ansätze wurden vereinigt und das DNS-Fragment mit Hilfe des PCR-Purification Kits gereinigt (Abschnitt 5.3.8.1). Das Eluat wurde zur Hydrolyse mit den Enzymen AgeI und NotI eingesetzt. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme durch 20minütige Inkubation bei 80 °C hitzeinaktiviert. Das DNS-Fragment wurde erneut mit Hilfe des PCR-Purification Kits gereinigt (Abschnitt 5.3.8.1) und in 50 µl EB-Puffer eluiert. Die erhaltene Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt (Abschnitt 5.3.7) und ergab 87 ng/µl. 50 ng Vektor pEGFP1 wurden mit dem 3fachen molaren Überschuss des SEAP-PCR-Produktes in einem Ligationsansatz eingesetzt (Abschnitt 5.3.11). Die Ligase wurde hitzeinaktiviert und der Ligationsansatz in kompetente DH5α-Zellen transformiert (Abschnitt 5.3.3). 40 der erhaltenen Transformanten wurden zur analytischen Plasmidpräparation (Abschnitt 5.3.4) eingesetzt und die Plasmide mit Hilfe des Enzyms NotI analysiert (Abschnitt 5.3.9). 5 der untersuchten Plasmide zeigten das erwartete Restriktionsmuster. Transformand 3 und 10 wurden in weiteren Restriktionsanalyse mit den Enzymen NotI bzw. NotI/AgeI eingesetzt und in einem 1 %igen Agarosegel analysiert. Als Vergleich diente der Vektor pEGFP1 (Abbildung 6.21).

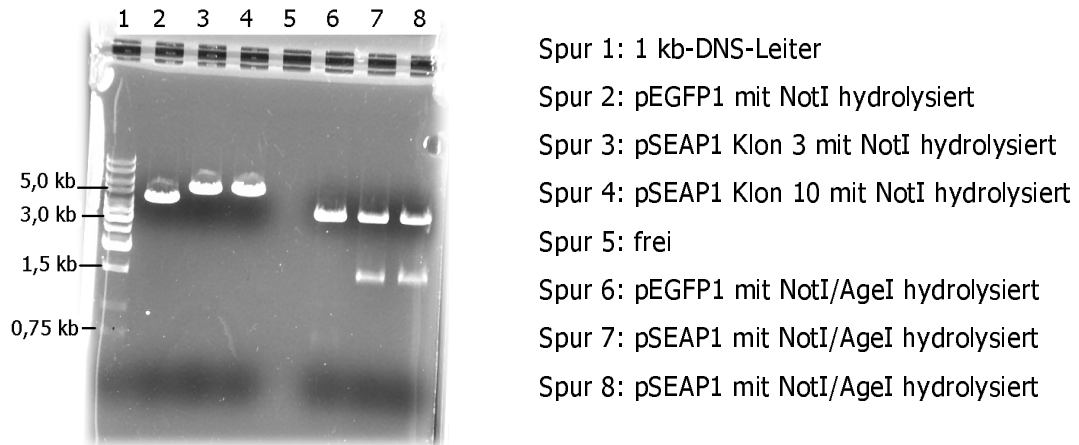


Abb. 6.21: 1 %iges Agarosegel der Restriktionsanalyse der Transformanden 3 und 10 aus der analytischen Plasmidpräparation.

Auf dem Gel waren Banden der erwarteten Größen von 1,5 kb und 3,4 kb nach Hydrolyse mit den Enzymen AgeI und NotI, bzw. 5,0 kb nach Hydrolyse mit NotI zu erkennen. Das EGFP-Gen war somit durch das SEAP Gen ersetzt worden. Der Klon 3 wurde in einer präparativen Plasmidisolierung, wie unter Abschnitt 5.3.6 beschrieben, eingesetzt, wobei 1 ml Plasmid-DNS mit einer Konzentration von 708 ng/μl und einer Reinheit von 1,8 erhalten wurde. Die Sequenzierung des SEAP-Gens wurde, wie unter Abschnitt 5.3.14 beschrieben, durchgeführt und ergab eine fehlerfreie Sequenz. Der erhaltene Vektor wurde als pSEAP-1 bezeichnet und ist in der Abbildung 6.22 dargestellt.

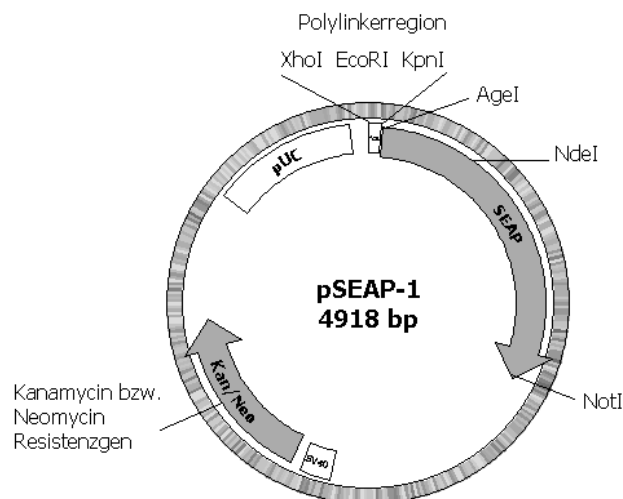


Abb. 6.22: Darstellung des Vektors pSEAP1 mit einer Größe von 5,0 kb. Der promotorlose Vektor trägt das Gen für die Sezernierte Alkalische Phosphatase hinter einer Polylinkerregion als Reportergen. Durch die Resistenzgene Kanamycin bzw. Neomycin ist eine Selektion in Bakterien bzw. Säugerzellen möglich.

6.5.2.2 Konstruktion des Vektors pSEAP-N1

Zur Etablierung des SEAP-Fluoreszenztests war es von Vorteil, einen Vektor zu besitzen, der die SEAP konstitutiv und stark exprimiert. Zu diesem Zweck wurde der Vektor pSEAP-N1 hergestellt, der die SEAP unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthält. Als Ausgangsvektor diente das Plasmid pEGFP-N1 von Clontech (Abschnitt 4.14.3). Dieses hat eine Größe von 4,5 kb und enthält eine rotverschobene Variante des Wildtyp-GFP Gens zur Herstellung N-terminaler Fusionsproteine hinter einem CMV-Promotor. Zum Austausch des EGFP durch die SEAP waren die passende Restriktionsschnittstellen AgeI und NotI vorhanden.

Jeweils 10 µg pEGFP-N1 und pSEAP-1 wurden mit den Restriktionsendonukleasen AgeI und NotI hydrolysiert (Abschnitt 5.3.9). Hierbei wurde aus dem Vektor pEGFP-N1 das EGFP-Gen und aus dem Vektor pSEAP-1 das SEAP-Gen entfernt. Die 5'-Enden des hydrolysierten pEGFP-N1 wurden dephosphoryliert und die Enzyme beider Restriktionsansätze hitzeinaktiviert (Abschnitt 5.3.10). Die DNS beider Ansätze wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetragen, die Fragmente getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV-Licht wurde mit einem sauberen Skalpell die Bande des linearisierten Vektors pEGFP-N1 bei einer Größe von 4,0 kb und die Bande des SEAP-Gens bei einer Größe von 1,5 kb aus dem Gel ausgeschnitten. Mit Hilfe des QiaQuick-Gelextraktions-Kits (Abschnitt 5.3.8.2) wurde die DNS aus dem Gel mit 50 µl EB-Puffer eluiert und die Konzentration der Lösung spektralphotometrisch bestimmt (Abschnitt 5.3.7). In der Tabelle 6.3 ist das Ergebnis der DNS-Elution aus dem Agarosegel dargestellt.

Tab. 6.3: Ergebnis der Gelelution des Vektors pEGFP-N1 und dem SEAP-Gen .

	pEGFP-N1	SEAP
Konzentration	81 ng/µl	78 ng/µl
Reinheit	1,5	1,5
Gesamtvolumen	40 µl	40 µl

50 ng des Vektors pEGFP-N1 wurden mit dem 3fachen molaren Überschuss des SEAP-Gens in einer Ligrationsreaktion eingesetzt (Abschnitt 5.3.11). Der Ligrationsansatz wurde in kompetente DH5α-Zellen transformiert (Abschnitt 5.3.3) und die Plasmide von 12 der erhaltenen Transformanten in einer analytischen Plasmidisolierung (Abschnitt 5.3.4)

analysiert. Alle untersuchten Plasmide zeigten das erwartete Restriktionsmuster nach Hydrolyse mit dem Enzym NotI. Der Transformand Nr. 1 wurde in einer präparativen Plasmidisolierung, wie unter Abschnitt 5.3.6 beschrieben, eingesetzt. 1 µg Plasmid-DNS aus der präparativen Plasmidisolierung wurde mit den Enzymen NdeI und AgeI/NotI hydrolysiert. NdeI hydrolysiert das Plasmid pSEAP-N1 an den Positionen 234 und 947, so dass Fragmente der Größen 713 bp und 4813 bp entstehen. AgeI und NotI hydrolysieren den Vektor an den Positionen 666 und 2194, so dass Fragmente der Größen 1528 bp und 3998 bp entstehen. Die DNS der Restriktionsansätze wurden in einem 1 %igen Agarosegel getrennt und hinsichtlich Größe und Qualität analysiert (Abbildung 6.23).

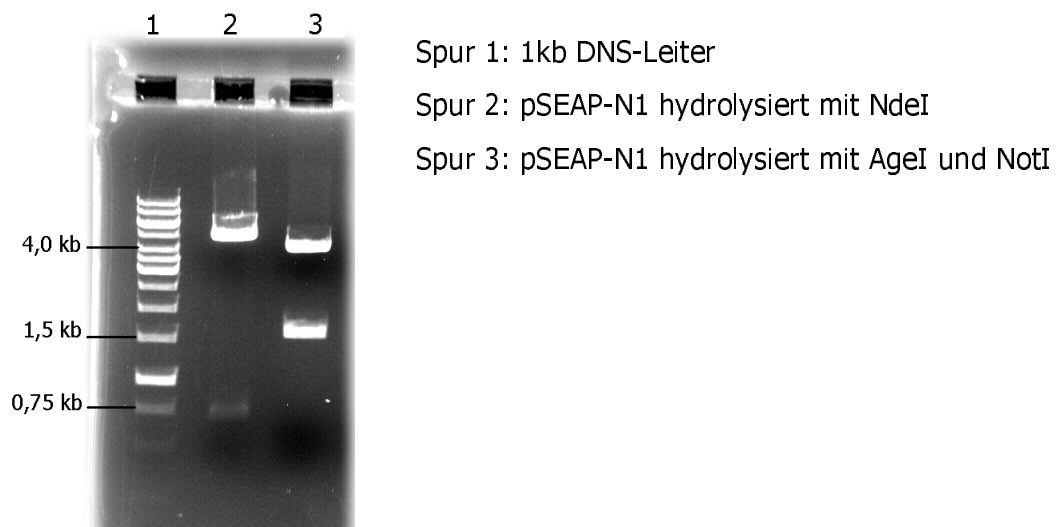


Abb. 6.23: 1 %iges Agarosegel der Restriktionsanalyse des Vektors pSEAP-N1 mit den Restriktionsendonukleasen NdeI bzw. AgeI und NotI.

In den jeweiligen Restriktionsansätzen waren die Fragmente der erwarteten Größen vorhanden. Das EGFP Gen war somit durch das SEAP Gen ersetzt worden. Der erhaltene Vektor wurde als pSEAP-N1 bezeichnet, hat eine Größe von 5526 bp und ist in der Abbildung 6.24 dargestellt.

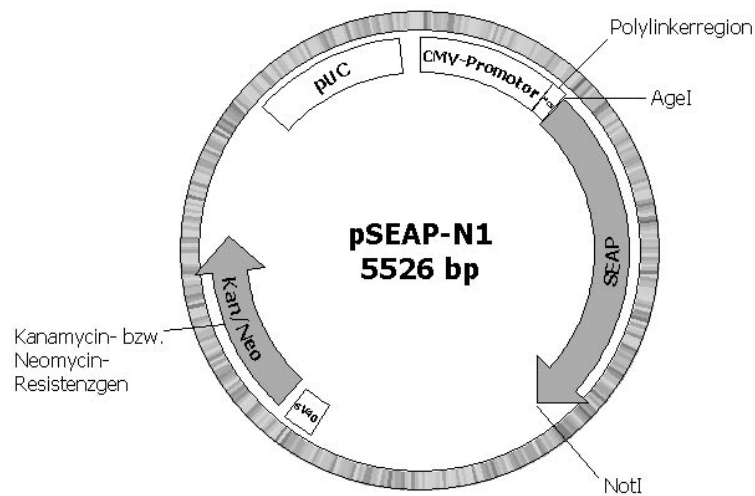


Abb. 6.24: Vektor pSEAP-N1 mit einer Größe von 5526 bp. SEAP: Gen der Sezernierten Alkalischen Phosphatase, CMV-Promotor: starker, konstitutiver Promotor des Cytomegalovirus, Kan/Neo: Resistenzgene zur Selektion in Bakterien bzw. in Säugerzellen

6.5.2.3 Herstellung des Promotortestplasmides pSEAP1-3,0kb

Zur Untersuchung der scherstressabhängigen Regulation des Tsp-1 Promotors wurde dieser in die Polylinkerregion des zuvor generierten Vektors pSEAP1 kloniert. Hierfür wurden die Restriktionsendonukleasen XhoI und KpnI ausgewählt. Diese hydrolysieren den Vektor pSEAP1 an den Positionen 21 und 41 innerhalb der Polylinkerregion, kommen aber in der Nukleotidsequenz des Tsp-1 Promotors zwischen den Positionen –2217 bis +754 nicht vor. Die Tsp-1 Promotorregion wurde durch die Polymerase-Kettenreaktion aus genomischer DNS amplifiziert. Hierfür wurden Oligonukleotide verwendet, an deren 5'-Ende die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen XhoI (Forward-Primer) und KpnI (Reverse-Primer) angefügt waren.

Frisch präparierte HUVEC wurden in einer 25-cm²-Flasche bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert (Abschnitt 5.2.6.2) und die genomische DNS, wie unter Abschnitt 5.3.12 beschrieben, isoliert. Die Konzentration und Reinheit wurde spektralphotometrisch bestimmt (Abschnitt 5.3.7). In der Tabelle 6.4 sind die Konzentration und die Reinheit der isolierten genomischen DNS aus HUVEC der Passage 0 dargestellt:

Tab. 6.4: Konzentration und Reinheit der isolierten genomischen HUVEC-DNS.

	genomische DNS
Konzentration	46 ng/μl
Reinheit	1,9
Gesamtvolumen	200 μl

Der 2971 bp umfassende Promotorbereich von Position –2217 bis +754 sollte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion aus genomischer DNS erzeugt werden. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter Abschnitt 4.12 dargestellt. In der Abbildung 6.25 ist die Amplifikation des Tsp-1 Promotors schematisch gezeigt:

Chromosom 15

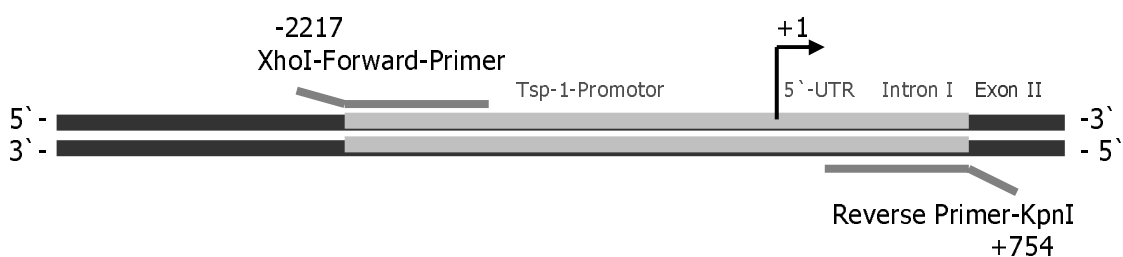


Abb. 6.25: Schematische Darstellung der Amplifikation des 2971 bp großen Tsp-1 Promotorfragmentes ausgehend von genomischer HUVEC-DNS

Zunächst wurden PCR-Amplifikationen mit einer *Taq*-Polymerase durchgeführt, die zu einem Produkt der erwarteten Größe von 3,0 kb führten. Eine Sequenzanalyse dieses PCR-Produktes ergab, dass es sich zwar um den gesuchten Promotorbereich handelte, die Basensequenz jedoch fehlerhaft war. Daher wurde der gesamte Promotor mit einer *Pwo*-Polymerase amplifiziert, die Korrekturlesefunktion besitzt. Hierbei wurde kein Produkt größer

als 1,5 kb erhalten. In einem weiteren Versuch wurde eine Kombination aus *Taq*-Polymerase und einer Polymerase mit Korrekturlesefunktion verwendet. Diese Mischung sollte die hohe Prozessivität der *Taq*-Polymerase mit der Genauigkeit einer *Proof Reading*-Polymerase verbinden. Die Reaktion wurde entsprechend den Herstellerangaben von ABgene, wie unter Abschnitt 5.3.13.2 beschrieben, durchgeführt. Es wurden 4 PCR-Ansätze pipettiert. Nach Ablauf der Amplifikation wurden 5 µl jedes PCR-Ansatzes in einem 1 %igen Agarosegel getrennt (Abschnitt 5.3.7) und hinsichtlich Größe und Qualität analysiert (Abbildung 6.26).

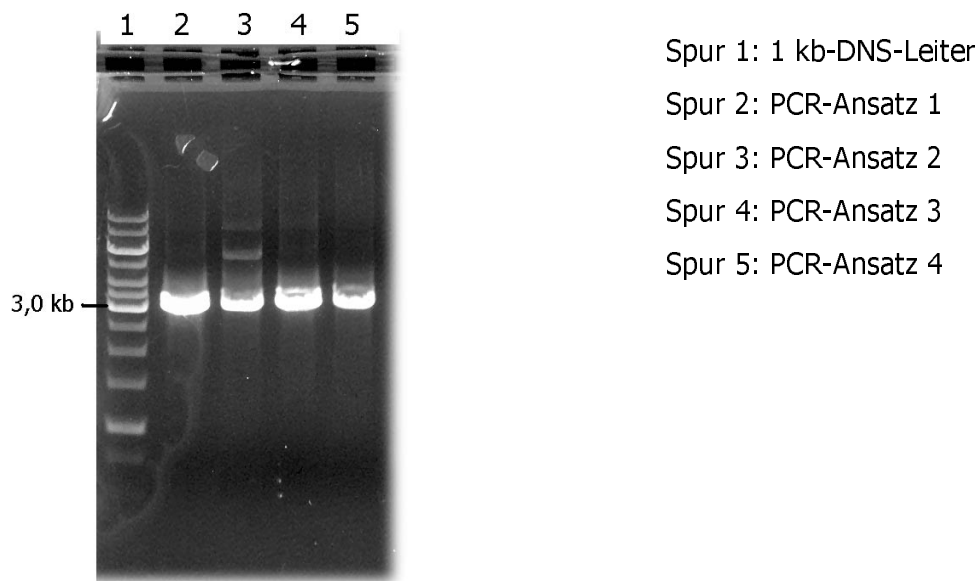


Abb. 6.26 1 %iges Agarosegel mit den PCR-Ansätzen 1-4 der Amplifikation des 3,0 kb Tsp-1 Promotors.

In allen 4 PCR-Ansätzen war als Hauptprodukt eine Bande bei einer Größe von 3,0 kb zu erkennen. Dies entsprach der erwarteten Größe des Tsp-1 Promotors von der Position -2217 bis +754. Die PCR-Ansätze wurden vereinigt und die Fragmente mit Hilfe des PCR-Purification-Kits, wie unter Abschnitt 5.3.8.1 beschrieben, gereinigt. Zur Insertion des Tsp1 Promotors in den Vektor pSEAP1 wurden beide in einer präparativen Restriktion mit den Enzymen XhoI und KpnI eingesetzt (Abschnitt 5.3.9). Die 5'-Enden des Vektors pSEAP1 wurden, wie unter Abschnitt 5.3.10 beschrieben, dephosphoryliert und die Enzyme beider Ansätze hitzeinaktiviert. Die Fragmente beider Restriktionsansätze wurden anschließend mit Hilfe des PCR-Purification-Kits (Abschnitt 5.3.8.1) gereinigt. Die Konzentrationen und Reinheiten sind in der Tabelle 6.5 dargestellt.

Tab. 6.5: Konzentrationen und Reinheiten des Vektors pSEAP1 und des 3,0 kb PCR-Produktes in 50 µl EB-Puffer nach Restriktion mit den Enzymen KpnI und XhoI.

	pSEAP1	3,0 kb Tsp-1 PCR-Produkt
Konzentration	112 ng/µl	25 ng/µl
Reinheit	1,5	1,5
Gesamtvolumen	50 µl	50 µl

100 ng pSEAP1 wurden mit dem 3fachen molaren Überschuss PCR-Produkt in einem Ligationsansatz eingesetzt (Abschnitt 5.3.11). Der Ligationsansatz wurde in kompetente DH5 α -Zellen transformiert (Abschnitt 5.3.3) und 30 der erhaltenen Transformanten in einer analytischen Plasmidisolierung (Abschnitt 5.3.4) eingesetzt. Die Plasmid DNS wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym XhoI analysiert. Hierbei zeigten 7 Plasmide das erwartete Restriktionsmuster. Der Transformant 18 wurde ausgewählt und zur präparativen Plasmidisolierung, wie in Abschnitt 5.3.6 beschrieben, eingesetzt und die Plasmid-DNS sequenziert (Abschnitt 5.3.14). Das Plasmid wurde als pSEAP1-3,0kb bezeichnet und hat eine Größe von 7891 bp.

6.5.2.4 Herstellung des Promotortestplasmides pSEAP1-1,9kb

Zur Klonierung des 1926 bp großen Tsp-1 Promotorfragmentes von Position –1189 bis +754 in den Reportergenvektor pSEAP1 (Abschnitt 6.5.2.1) wurde der zuvor generierte Vektor pSEAP1-3,0kb (Abschnitt 6.5.2.3) verwendet. Die Klonierung erfolgte über die singulären Restriktionsschnittstellen EcoRI und KpnI, die den Vektor pSEAP1 innerhalb der Polylinkerregion an den Positionen 31 und 41 hydrolysieren. Der Tsp-1-Promotor wurde durch EcoRI an der Position –1189 und durch KpnI an der Position +754 hydrolysiert. Dem entstandenen Tsp-1 Promotorfragment fehlten somit die Basenpaare –2217 bis –1189, die eine potenzielle GATA und Egr-1 Bindestelle enthalten.

3 µg des Plasmids pSEAP1-3,0kb wurden mit den Restriktionsenzymen KpnI und EcoRI hydrolysiert (Abschnitt 5.3.9). Entsprechend wurden 3 µg des Vektors pSEAP1 hydrolysiert und anschließend durch Zugabe von 1,5 Einheiten SAP dephosphoryliert (Abschnitt 3.5.10). Die Enzyme wurden hitzeinaktiviert. Die Fragmente des Restriktionsansatzes von pSEAP1 wurden mit Hilfe des PCR-Purification-Kits gereinigt (Abschnitt 5.3.8.1) und bis zur Ligation

bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Fragmente des Restriktionsansatzes von pSEAP1-3,0kb wurden in einem 1 %igen Agarosegel getrennt und das Fragment bei 1,9 kb ausgeschnitten. Die DNS wurde mit Hilfe des QiaQuick-Gelextraktions-Kits (Abschnitt 5.3.8.2) aus dem Gel eluiert und das erhaltene Fragment im 3fachen molaren Überschuss mit dem hydrolysierten Vektor pSEAP1 in einem Ligationsansatz über Nacht eingesetzt (Abschnitt 5.3.11). Der Ligationsansatz wurde in kompetente DH5 α -Zellen transformiert (Abschnitt 5.3.3) und die Plasmid DNS von 14 der erhaltenen Transformanden wurde zur analytischen Plasmidpräparation (Abschnitt 5.3.4) und Restriktionsanalyse mit den Enzymen XhoI und KpnI eingesetzt (Abschnitt 5.3.9). Alle Plasmide bis auf das des Transformand Nr. 11 zeigten das erwartete Restriktionsmuster. Der Transformand Nr. 1 wurde ausgewählt und in einer präparativen Plasmidisolierung (Abschnitt 5.3.6) eingesetzt. Das erhaltene Plasmid hatte eine Größe von 6843 bp und wurde als pSEAP1-1,9kb bezeichnet.

6.5.2.5 Herstellung des Promotortestplasmides pSEAP1-1,8kb

Ein 1835 bp großer Bereich von Position -1081 bis $+754$ des Tsp-1-Promotors wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Abschnitt 5.3.13) aus dem Vektor pSEAP1-3,0kb erzeugt. Die zur Klonierung in die Polylinkerregion des Plasmids pSEAP1 notwendigen Restriktionsschnittstellen wurden durch Verwendung von PCR-Primern mit zusätzlichen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme EcoRI und KpnI am 5'-Ende eingeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter Abschnitt 4.12 dargestellt.

Die Oligonukleotide flankieren den Bereich des Tsp-1 Promotors von der Position -1081 bis $+754$ bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt. Dem Tsp-1 Promotorfragment fehlten somit die möglichen GATA- und Egr1-Bindestellen sowie die Sequenz des SSRE, die sich an der Position -1126 befindet. Die Amplifikation des 1,8 kb großen Tsp-1 Promotorfragmentes ist in der Abbildung 6.27 schematisch dargestellt.

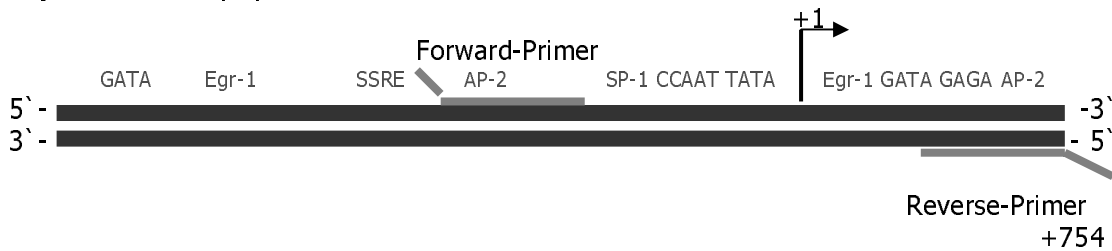
Tsp-1-Promotor, 3,0 kb

Abb. 6.27: Schematische Darstellung der Amplifikation des 1835 bp großen Tsp-1 Promotorbereiches.

Zur Polymerase-Kettenreaktion wurde eine *Pwo*-Polymerase mit Korrekturlesefunktion verwendet, um den fehlerhaften Einbau von Nukleotiden bei der Amplifikation auszuschließen. Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm sind unter Abschnitt 5.3.13.3 aufgeführt. Es wurden 3 PCR-Ansätze pipettiert. Nach Ablauf der Reaktion wurden 5 µl je Ansatz in einem 1 %igen Agarosegel getrennt (Abschnitt 5.3.7) und hinsichtlich Größe und Qualität analysiert (Abbildung 6.28).

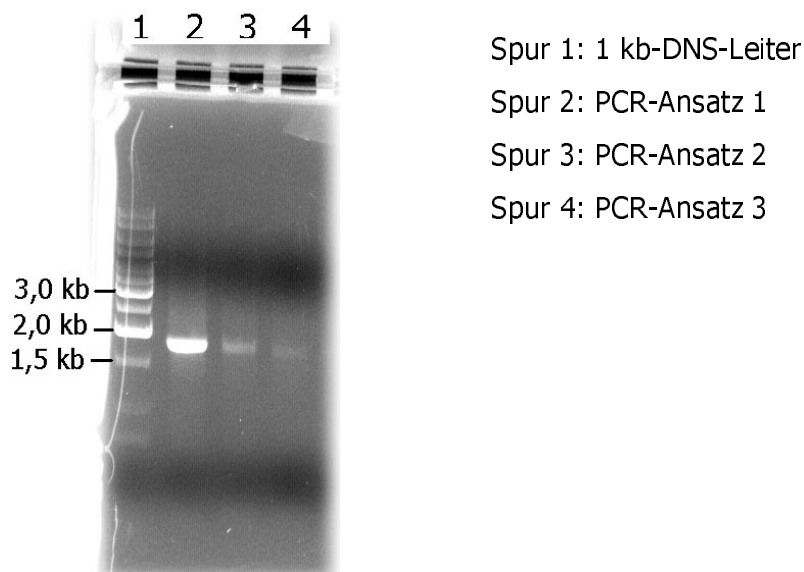


Abb. 6.28: 1 %iges Agarosegel mit den PCR-Ansätzen 1-3 der Amplifikation des 1,8 kb Tsp-1 Promotor-fragmentes.

In allen drei Ansätzen war das Produkt der PCR-Reaktion mit der erwarteten Größe von 1835 bp enthalten. Die PCR-Ansätze wurden vereinigt und das Fragment mit Hilfe des PCR-Purification-Kits (Abschnitt 5.3.8.1) gereinigt. Die erhaltene DNS-Lösung hatte eine Konzentration von 65 ng/µl und eine Reinheit von 1,9. Der Vektor pSEAP1 und das 1,8 kb große PCR-Produkt wurden zur Restriktion mit den Enzymen EcoRI und KpnI eingesetzt

(Abschnitt 5.3.9). Zur Dephosphorylierung der 5'-Enden wurden dem Restriktionsansatz des Vektors pSEAP1 5 Einheiten SAP zugesetzt (Abschnitt 5.3.10). Die Enzyme wurden hitzeinaktiviert und die Fragmente der Restriktionsansätze mit Hilfe des PCR-Purification-Kits gereinigt (Abschnitt 5.3.8.1). 100 ng pSEAP1 wurden mit dem 3fachen molaren Überschuss des 1,8 kb großen Promotorfragmentes in einem Ligationsansatz (Abschnitt 5.3.11) eingesetzt und der Ligationsansatz wurde in kompetente DH5 α -Zellen transformiert (Abschnitt 5.3.3). 15 der erhaltenen Transformanten wurden in einer analytischen Plasmidpräparation eingesetzt (Abschnitt 5.3.4) und anschließend die Plasmid DNS mit dem Enzym EcoRI analysiert (Abschnitt 5.3.9). Hierbei zeigten 4 Plasmide eine Insertion. Eine genauere Analyse des inserierten Fragmentes mit den Restriktionsenzymen EcoRI/KpnI, NdeI und NotI zeigte, dass nur das Plasmid des Transformanten Nr. 11 ein Inseerat der richtigen Größe und Sequenz trug. Dieses wurde in einer präparativen Plasmidisolierung entsprechend den Angaben unter Abschnitt 5.3.6 eingesetzt und anschließend sequenziert (Abschnitt 5.3.14). Das generierte Promotortestplasmid war 6759 bp groß und wurde als pSEAP1-1,8kb bezeichnet.

6.5.2.6 Herstellung des Promotortestplasmides pSEAP1-1,4kb

Ein 1441 bp großer Bereich von Position -2217 bis -759 bezogen auf den Transkriptionsstart des Tsp-1 Promotors wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Abschnitt 5.3.13) aus dem Vektor pSEAP1-3,0kb erzeugt. Die zur Klonierung in die Polylinkerregion des Vektors pSEAP1 notwendigen Restriktionsschnittstellen wurden durch Verwendung von PCR-Primern mit zusätzlichen Erkennungssequenzen für die entsprechenden Restriktionsenzyme XhoI und KpnI am 5'-Ende eingeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter Abschnitt 4.12 dargestellt.

Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide flankieren den Bereich des Tsp-1 Promotors von der Position -2217 bis -759. Es handelt sich somit um ein Promotorfragment, das lediglich distale Bereiche des Tsp-1 Promotors enthält. Hier sind mögliche Bindestellen der Transkriptionsfaktoren GATA und Egr-1 sowie das SSRE vorhanden. Es fehlen nach Analyse des Programms MatInspector Release Professional 7.4.4 Elemente des Kernpromotorbereiches wie z.B. die TATA-Box oder ein Initiatorelement. In der Abbildung 6.29 ist die Amplifikation des 1,4 kb Tsp-1 Promotorfragmentes schematisch dargestellt.

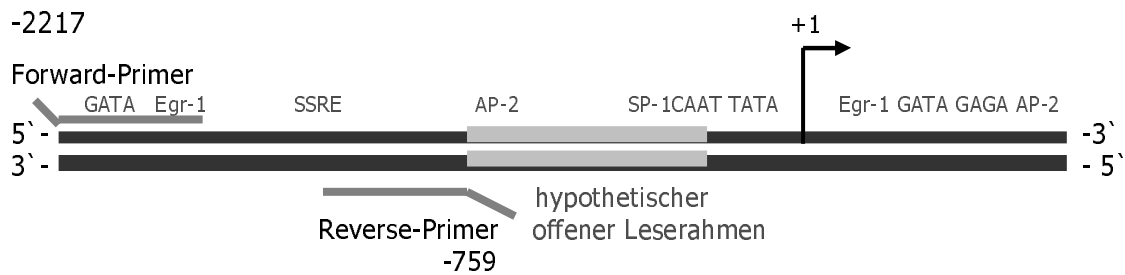


Abb. 6.29: Schematische Darstellung der Amplifikation des 1441 bp großen Tsp-1 Promotorfragmentes.

Zur Polymerase-Kettenreaktion wurde eine *Pwo*-Polymerase mit Korrekturlesefunktion verwendet, um den fehlerhaften Einbau von Nukleotiden bei der Amplifikation auszuschließen. Der PCR-Ansatz wurde, wie unter Abschnitt 5.3.13.4 beschrieben, pipettiert. Nach Ablauf der Reaktion wurden 5 µl des PCR-Ansatzes in einem 1 %igen Agarosegel getrennt (Abschnitt 5.3.7) und hinsichtlich Größe und Qualität analysiert (Abbildung 6.30).

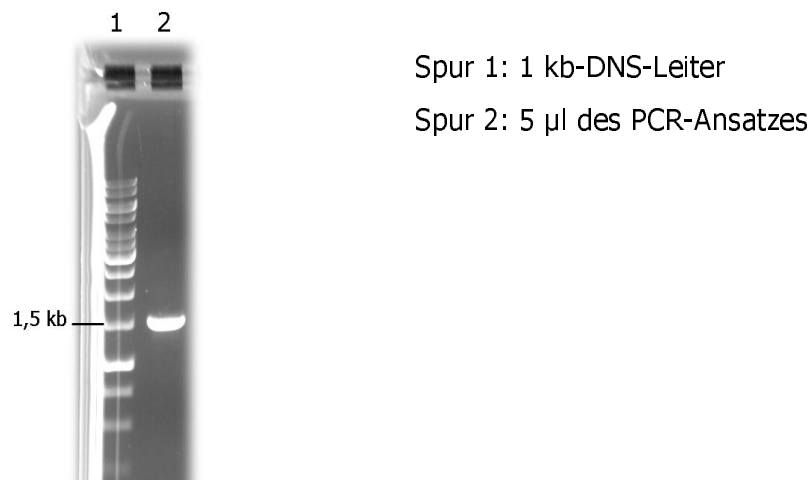


Abb. 6.30: 1 %iges Agarosegel des PCR-Ansatzes zur Amplifikation des 1,4 kb Tsp-1 Promotorfragmentes.

In dem PCR-Ansatz war das Produkt der PCR-Reaktion mit der erwarteten Größe von 1441 bp zu erkennen. Das Fragment wurde mit Hilfe des PCR-Purification Kits (Abschnitt 5.3.8.1) gereinigt und zur Restriktion mit den Enzymen XhoI und KpnI eingesetzt (Abschnitt 5.3.9). Die Restriktionsenzyme wurden bei 80 °C für 20 min hitzeinaktiviert und das Fragment des Restriktionsansatzes mit Hilfe des PCR-Purification-Kits gereinigt (Abschnitt 5.3.8.1) und in 50 µl EB-Puffer eluiert. Die DNS-Konzentration betrug 50 ng/µl. Das Tsp-1 Promotorfragment wurde im 3fachen molaren Überschuss in einem Ligationsansatz wie unter Abschnitt 5.3.11 beschrieben mit 100 ng des zuvor ebenfalls mit KpnI und XhoI hydrolysierten Vektors pSEAP1 eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde in kompetente DH-5α-Zellen transformiert (Abschnitt 5.3.3). Es wurden 45 Transformanten erhalten, von denen 8

zur analytischen Plasmidisolierung (Abschnitt 5.3.4) eingesetzt und die Plasmide anschließend mit den Enzymen KpnI und XhoI analysiert wurden (Abschnitt 5.3.9). Alle Plasmide zeigten das erwartete Restriktionsmuster. Die Plasmid DNS des Transformand Nr. 1 wurde in einer präparativen Plasmidisolierung (Abschnitt 5.3.6) eingesetzt und anschließend sequenziert. Das generierte Promotortestplasmid war 6339 bp groß und wurde als pSEAP1-1,4kb bezeichnet.

6.5.2.7 Herstellung des Promotortestplasmides pSEAP1-0,9kb

Ein 933 bp großer Bereich von Position -179 bis +754 Tsp-1 Promotors wurde über die Polymerase-Kettenreaktion (Abschnitt 5.3.13) aus dem Vektors pSEAP1-3,0kb (Abschnitt 6.5.2.3) erzeugt. Die zur Klonierung in die Polylinkerregion des Vektors pSEAP1 notwendigen Restriktionsschnittstellen wurden hierbei durch Verwendung von PCR-Primern mit zusätzlichen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme XhoI und KpnI am 5'-Ende eingeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter Abschnitt 4.12 dargestellt.

Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide flankieren den Bereich des Tsp-1 Promotors von der Position -179 bis +754. Das Promotorfragment enthielt somit die TATA- und CAAT-Box sowie zwei mögliche SP-1 Transkriptionsfaktorbindestellen. Außerdem war die 5'-UTR und das erste Intron des Tsp-1 Gens vorhanden. Es fehlten eine potenzielle GATA-Egr-1- und AP-2-Transkriptionsfaktorbindestelle sowie das SSRE. In der Abbildung 6.31 ist die Amplifikation des 0,9 kb Tsp-1 Promotorfragmentes schematisch dargestellt.

Tsp-1-Promotor, 3,0 kb

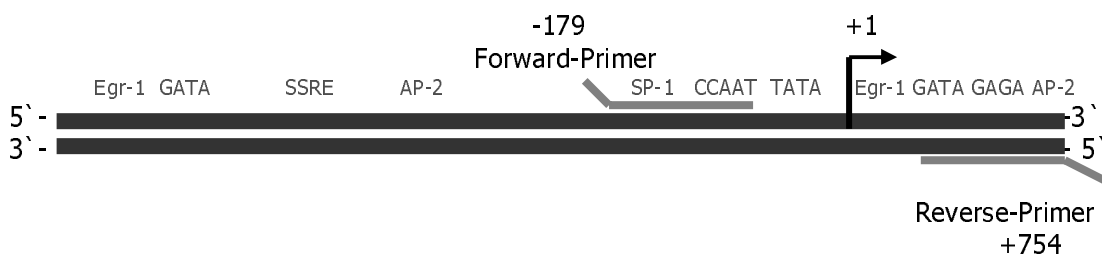


Abb. 6.31: Schematische Darstellung der Amplifikation des 0,9 kb Tsp-1 Promotorfragmentes.

In die Polymerase-Kettenreaktion wurde eine *Pwo*-Polymerase mit Korrekturlesefunktion eingesetzt, um den fehlerhaften Einbau von Nukleotiden bei der Amplifikation auszuschließen. Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm zur Amplifikation des 0,9 kb großen Tsp-1 Promotorfragmentes ist unter Abschnitt 5.3.13.5 dargestellt. 5 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1 %igen Agarosegel (Abschnitt 5.3.7) hinsichtlich Größe und Qualität analysiert (Abbildung 6.32).

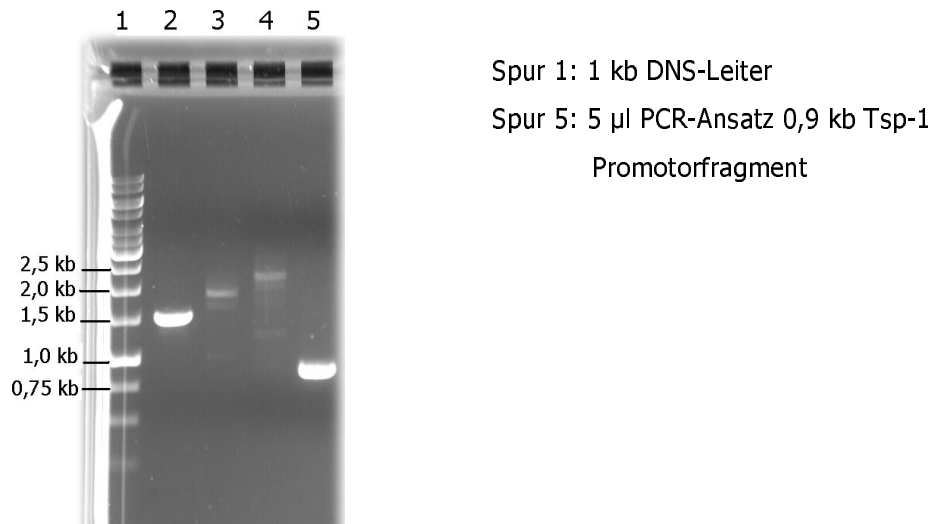


Abb. 6.32: 1 %iges Agarosegel mit den PCR-Ansätzen unter anderem zur Amplifikation des 0,9 kb Tsp-1 Promotorfragmentes.

Im PCR-Ansatz des 0,9 kb Tsp-1 Promotorfragmentes war eine Bande mit der erwarteten Größe von 933 bp zu erkennen. Das Fragment wurde mit Hilfe des PCR-Purification-Kits (Abschnitt 5.3.8.1) gereinigt und in 50 µl EB-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in einem Restriktionsansatz mit den Enzymen KpnI und XhoI hydrolysiert (Abschnitt 5.3.9). Die Enzyme wurden hitzeinaktiviert, die Fragmente des Restriktionsansatzes mit Hilfe des PCR-Purification Kits (Abschnitt 5.3.8.1) gereinigt und in EB Puffer eluiert. Die Konzentration betrug 48 ng/µl. Das Tsp-1 Promotorfragment wurde in einem Ligationsansatz mit dem zuvor ebenfalls mit KpnI und XhoI hydrolysierten und dephosphorylierten Vektor pSEAP1 (Abschnitt 5.3.11) eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde in kompetente DH-5 α -Zellen transformiert (Abschnitt 5.3.3). 8 der erhaltenen Transformanden wurde zur analytischen Plasmidisolierung (Abschnitt 5.3.4) eingesetzt und die Plasmid DNS anschließend mit den Enzymen KpnI und XhoI analysiert (Abschnitt 5.3.9). Alle Plasmide zeigten die erwarteten Fragmentgrößen. Die Plasmid-DNS des Transformand Nr. 1 wurde in einer präparativen Plasmidisolierung, wie unter Abschnitt 5.3.6 beschrieben, eingesetzt und anschließend sequenziert (Abschnitt 5.3.14). Das generierte Promotortestplasmid war 5851 bp groß und wurde als pSEAP1-0,9kb bezeichnet.

6.5.2.8 Herstellung des Promotortestplasmides pSEAP1-2,2kb

Ein 2234 bp großer Bereich von Position -2217 bis +17 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des Tsp-1 Promotors wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Abschnitt 5.3.13) aus dem Vektors pSEAP1-3,0kb erzeugt. Die zur Klonierung in die Polylinkerregion des Vektors pSEAP1 notwendigen Restriktionsschnittstellen wurden durch Verwendung von PCR-Primern mit zusätzlichen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme XhoI und KpnI am 5'-Ende eingeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter Abschnitt 4.12 dargestellt.

Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide flankieren den Bereich des Tsp-1 Promotors von der Position -2217 bis +33 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt. Dem entstandenen Promotorfragment fehlte somit ein Teil der 5'-UTR und das gesamte erste Intron des Tsp-1 Gens. In diesem befanden sich mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen für Egr-1, GATA und AP-2 sowie eine GAGA-Box. In der Abbildung 6.33 ist die Amplifikation des 2,2 kb großen Tsp-1 Promotorfragmentes schematisch dargestellt.

3,0 kb-Tsp-1 Promotor



Abb. 6.33: Schematische Darstellung der Amplifikation des 2,2 kb großen Tsp-1 Promotorfragmentes.

In die Polymerase-Kettenreaktion wurde eine *Pwo*-Polymerase mit Korrekturlesefunktion eingesetzt, um den fehlerhaften Einbau von Nukleotiden während der Amplifikation auszuschließen. Der PCR-Ansatz und das Programm zur Amplifikation des 2,2 kb Tsp-1 Promotorfragmentes sind unter Abschnitt 5.3.13.6 dargestellt. 5 µl des PCR-Ansatzes wurden in einem 1 %igen Agarosegel (Abschnitt 5.3.7) hinsichtlich Größe und Qualität analysiert (Abbildung 6.34).

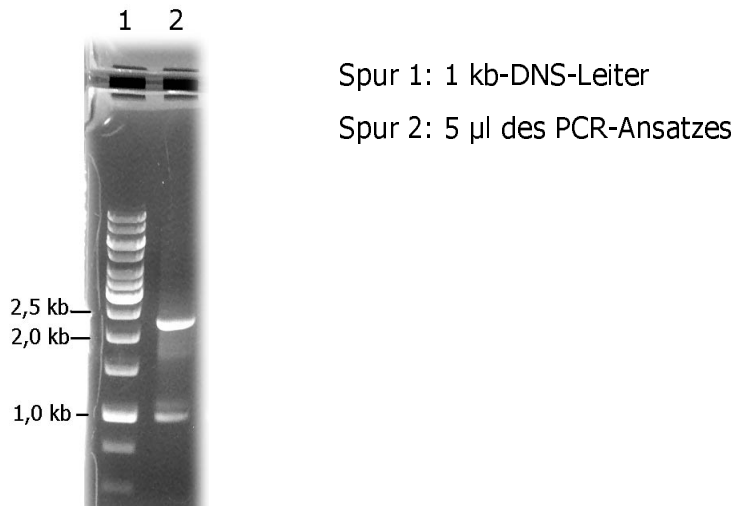


Abb. 6.34: 1 %iges Agarosegel der Amplifikation des 2,2 kb großen Tsp-1 Promotorfragmentes.

Es konnte ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 2,2 kb erhalten werden. Jedoch enthielt der PCR-Ansatz ein Nebenprodukt von ca. 1 kb. Der PCR-Ansatz wurde trotzdem in die Klonierung eingesetzt. Die Fragmente wurde mit Hilfe des PCR-Purification-Kits (Abschnitt 5.3.8.1) gereinigt und in 50 µl EB-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in einem Restriktionsansatz mit den Enzymen KpnI und XhoI hydrolysiert (Abschnitt 5.3.9). Anschließend wurden die Enzyme hitzeinaktiviert, die Fragmente des Restriktionsansatzes mit Hilfe des PCR-Purification Kits (Abschnitt 5.3.8.1) gereinigt und in 50 µl EB-Puffer eluiert. Die erhaltene DNS-Konzentration betrug 43 ng/µl. Der Vektor pSEAP1 wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI hydrolysiert und anschließend dephosphoryliert (Abschnitt 5.3.9). 200 ng Vektor wurden mit dem 3fachen molaren Überschuss des 2,2 kb Tsp-1 Promotorfragmentes in einem Ligationsansatz eingesetzt (Abschnitt 5.3.11). Der Ligationsansatz wurde in kompetente DH5 α -Zellen transformiert (Abschnitt 5.3.3), wobei ca. 200 Transformanten erhalten wurden. 10 der erhaltenen Transformanten wurden in einer analytischen Plasmidisolierung (Abschnitt 5.3.4) eingesetzt und die Plasmid DNS mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI analysiert (Abschnitt 5.3.9). Hierbei zeigte nur 1 Plasmid Fragmente der erwarteten Größen. Dieser wurde zur präparativen Plasmidisolierung, wie unter Abschnitt 5.3.6 beschrieben, eingesetzt und anschließend sequenziert (Abschnitt 5.3.14). Das generierte Plasmid hatte eine Größe von 7152 bp und wurde als pSEAP1-2,2kb bezeichnet.

6.5.2.9 Herstellung des Promotortestplasmides pSEAP1-2,6kb

Ein 2569 bp großer Bereich von Position -2217 bis +352 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des Tsp-1 Promotors wurde über die Polymerase-Kettenreaktion (Abschnitt 5.3.13) aus dem Vektor pSEAP1-3,0kb erzeugt. Die zur Klonierung in die Polylinkerregion des Vektors pSEAP1 notwendigen Restriktionsschnittstellen wurden hierbei durch Verwendung von PCR-Primern mit zusätzlichen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme XhoI und KpnI am 5'-Ende eingeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter Abschnitt 4.12 dargestellt.

Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide flankieren den Bereich des Tsp-1 Promotors von der Position -2217 bis +352. Dem entstandenen Promotorfragment fehlte somit ein Teil des ersten Introns in dem sich eine potenzielle GATA- und AP-2-Transkriptionsfaktorbindestelle sowie eine GAGA-Box befand. In der Abbildung 6.35 ist die Amplifikation des 2,6 kb großen Tsp-1 Promotorfragmentes schematisch dargestellt.

3,0kb-Tsp-1-Promotor

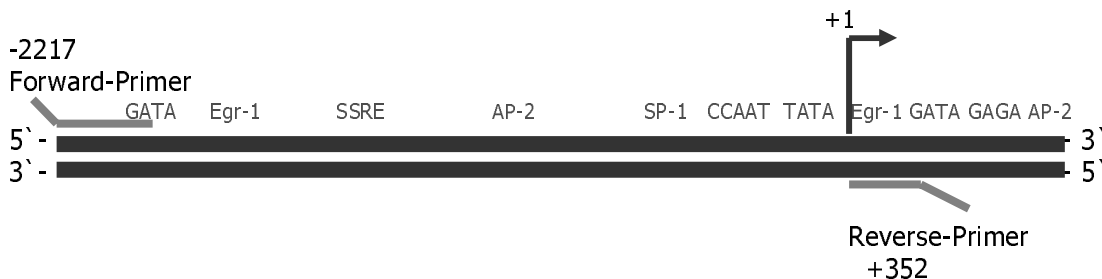


Abb. 6.35: Schematische Darstellung der Amplifikation des 2,6 kb großen Tsp-1 Promotorfragmentes.

In die Polymerase-Kettenreaktion wurde eine *Pwo*-Polymerase mit Korrekturlesefunktion eingesetzt, um den fehlerhaften Einbau von Nukleotiden bei der Amplifikation auszuschließen. Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm sind unter Abschnitt 5.3.13.7 dargestellt. 5 µl des PCR-Ansatzes wurden in einem 1 %igen Agarosegel (Abschnitt 5.3.7) hinsichtlich Größe und Qualität analysiert (Abbildung 6.36).



Spur 1: 1 kb-DNS-Leiter

Spur2: 5 µl PCR-Ansatz 1

Abb. 6.36: 1 %iges Agarosegel des PCR-Ansatzes zur Amplifikation des 2,6 kb großen Tsp-1 Promotorfragmentes.

Der PCR-Ansatz enthält ein DNS-Fragment mit der erwarteten Größe von 2,6 kb. Die DNS des PCR-Ansatzes wurde mit Hilfe des PCR-Purification Kits gereinigt (Abschnitt 5.3.8.1) und in 50 µl EB-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in einem Restriktionsansatz mit den Enzymen KpnI und XhoI hydrolysiert (Abschnitt 5.3.9), die Enzyme anschließend hitzeinaktiviert und die DNS des Restriktionsansatzes mit Hilfe des PCR-Purification Kits (Abschnitt 5.3.8.1) gereinigt. Die erhaltene DNS-Konzentration betrug 55 ng/µl. Der Vektor pSEAP1 wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI hydrolysiert und anschließend dephosphoryliert (Abschnitt 5.3.9). 100 ng des hydrolysierten Vektor pSEAP-1 wurden in einem Ligationsansatz mit dem dreifachen molaren Überschuss des 2,6 kb großen Tsp-1 Promotorfragmentes eingesetzt (Abschnitt 5.3.11). Der Ligationsansatz wurde in kompetente DH5 α -Zellen transformiert (Abschnitt 5.3.3), wobei ca. 200 Transformanten erhalten wurden. 8 der erhaltenen Transformanten wurde in einer analytischen Plasmidisolierung (Abschnitt 5.3.4) eingesetzt und die Plasmid DNS mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI analysiert. Zwei der untersuchten Plasmide enthielten eine Insertion. Diese wurden zur genaueren Charakterisierung mit den Restriktionsendonukleasen KpnI, XhoI, KpnI/XhoI und AgeI, wie unter Abschnitt 5.3.9 beschrieben, hydrolysiert (Abbildung 6.41 Abschnitt 6.5.3). Nur einer der beiden Plasmide zeigte nach Hydrolyse mit den entsprechenden Enzymen Fragmente der erwarteten Größen. Die Plasmid DNS des Transformanten wurde zur präparativen Plasmidisolierung wie unter Abschnitt 5.3.6 beschrieben eingesetzt und anschließend sequenziert (Abschnitt 5.3.14). Das generierte Promotortestplasmid hat eine Größe von 7487 bp und wurde als pSEAP1-2,6kb bezeichnet.

6.5.2.10 Herstellung des Promotortestplasmides pSEAP1-mSSRE

Um die Funktion des *Shear Stress Response Elements* (SSRE) von der Position –1117 bis –1123 in Bezug auf die scherstressabhängige Regulation der Tsp-1-Expression zu untersuchen, wurde die Kernsequenz der Bindestelle mutiert. Der gesamte Tsp-1 Promotorbereich wurde in zwei PCR-Fragmenten amplifiziert: Das erste Fragment war 1094 bp groß und umfasste den Bereich von Position –2217 bis –1122. Über das 5'-Ende des Reverse-Primers wurde die Erkennungssequenz der Restriktionsschnittstelle PvuI eingeführt. Das zweite Fragment war 1871 bp groß und umfasste den Bereich von der Position -1117 bis +754 des Tsp-1 Promotors. Über das 5'-Ende des Forward-Primers wurde die Hexanukleotidsequenz der Restriktionsendonuklease PvuI und zwei weitere Nukleotide eingeführt. Die beiden PCR-Fragmente wurden mit dem Enzym PvuI hydrolysiert und anschließend ligiert, so dass die Sequenz *GAGACCAG* des SSRE zur Sequenz *CGATCGGT* mutiert wurde. Die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease PvuI ist in rot und die beiden nicht komplementären Nukleotide in orange dargestellt. Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide sind unter Abschnitt 4.12 aufgeführt. In der Abbildung 6.37 ist die Amplifikation des Tsp-1 Promotors zur Mutation des SSRE schematisch dargestellt.

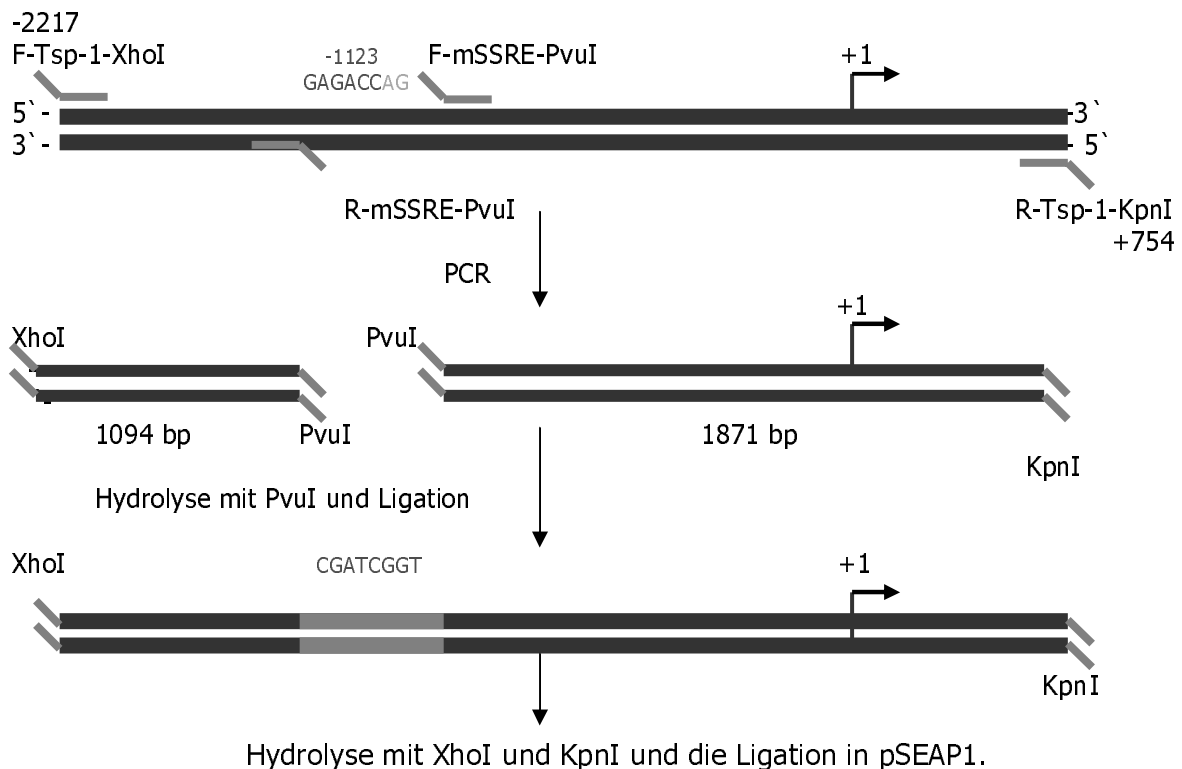


Abb. 6.37 Schematische Darstellung der Amplifikation des Vektors pSEAP1-mSSRE.

In die PCR wurde eine *Pwo*-Polymerase mit Korrekturlesefunktion eingesetzt, um fehlerhaft eingebaute Nukleotide bei der Amplifikation auszuschließen. Die PCR wurde entsprechend den Angaben unter Abschnitt 5.3.13.8 durchgeführt. 5 µl der PCR-Ansätze wurden in einem 1 %igen Agarosegel getrennt und hinsichtlich Größe und Qualität analysiert (Abbildung 6.38).

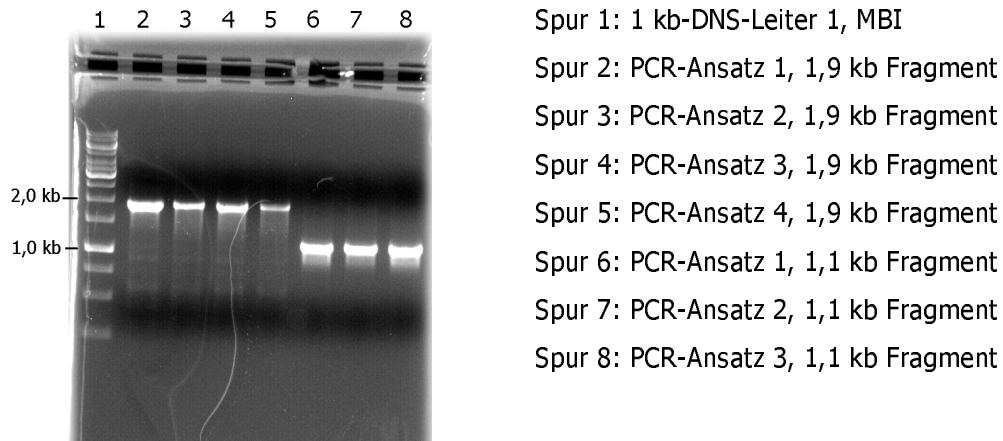


Abb. 6.38: 1 %iges Agarosegel der PCR-Ansätze nach Amplifikation des 1,9 kb und 1,1 kb Tsp-1 Promotorfragmentes.

In den Ansätzen zur Amplifikation des 1,9 kb Fragmentes waren Banden mit der erwarteten Größe von 1871 bp und in den Ansätzen zur Amplifikation des 1,1 kb Fragmentes waren Banden mit der erwarteten Größe von 1094 bp zu erkennen. Die PCR-Ansätze wurden jeweils vereinigt, die Fragmente mit Hilfe des PCR-Purification Kits gereinigt (Abschnitt 5.3.8.1) und in 50 µl EB-Puffer eluiert. Die Eluate wurden mit der Restriktionsendonuklease *PvuI* hydrolysiert und das Enzym anschließend hitzeinaktiviert (Abschnitt 5.3.9). Die Reinigung der DNS-Fragmente erfolgte mit Hilfe des PCR-Purification-Kits wie unter Abschnitt 5.3.8.1 beschrieben. In 10 Ansätzen wurden jeweils 400 ng des 1,9 kb großen Fragments mit der gleichen molaren Menge (252 ng) des 1,1 kb großen Fragments folgendermaßen zur Ligation eingesetzt: Alle Komponenten der Ligationsansätze mit Ausnahme der Ligase wurden pipettiert und 5 min auf 65 °C erhitzt. Die Ansätze wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und die Ligase zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die 10 Ligationsansätze wurden vereinigt und die Ligase 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Die Reinigung der DNS Fragmente erfolgte mit Hilfe des PCR-Purification-Kits (Abschnitt 5.3.8.1). Das Eluat wurde dann zur Hydrolyse mit den Enzymen *KpnI* und *XhoI*, wie unter Abschnitt 5.3.9 beschrieben, eingesetzt. Die Enzyme wurden hitzeinaktiviert und die DNS Fragmente mit Hilfe des PCR-Purification-Kits, wie unter Abschnitt 5.3.8.1 beschrieben, gereinigt. Ebenfalls mit *KpnI* und *XhoI* hydrolysierter Vektor pSEAP1 wurde mit

dem dreifachen molaren Überschuss des 3,0 kb-mSSRE-Inserats in einem Ligationsansatz eingesetzt (Abschnitt 5.3.11). Der Ligationsansatz wurde in kompetente DH5 α -Zellen transformiert (Abschnitt 5.3.3) wobei insgesamt 65 Transformanten erhalten wurden. Die Plasmid DNS von 28 der erhaltenen Transformanten wurden in einer analytischen Plasmidisolierung eingesetzt (Abschnitt 5.3.4) und mit dem Enzym PvuI analysiert. Fünf der isolierten Plasmide konnten durch Restriktion mit dem Enzym PvuI linearisiert werden (Abbildung 6.39). Da im Wildtyp-Tsp-1 Promotor keine PvuI Schnittstelle vorhanden war, sollten diese das mutierte SSRE enthalten.

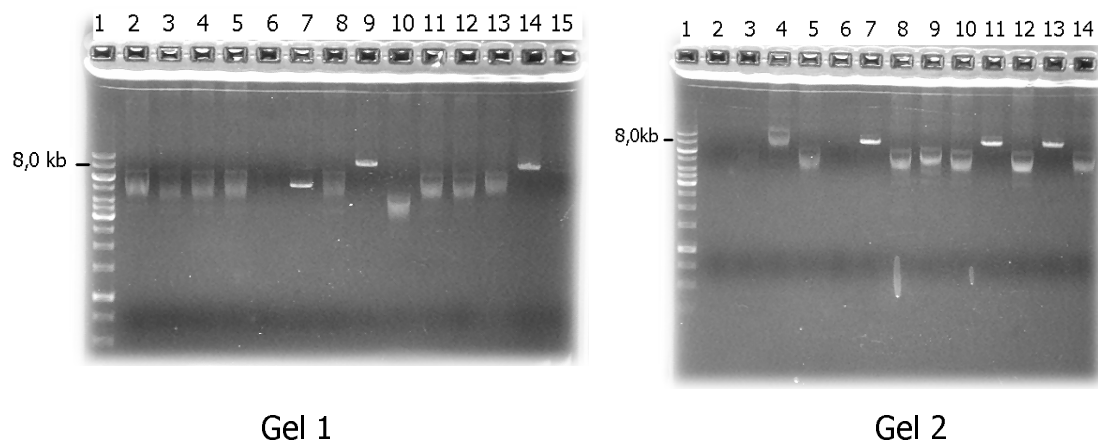


Abb. 6.39: 1 %ige Agarosegele der isolierten Plasmide nach Hydrolyse mit PvuI.

Das Plasmid in der Spur 7 im Gel 1 konnte zwar durch das Enzym PvuI linearisiert werden, zeigte aber nicht die erwartete Größe von 8,0 kb. In einer präparativen Plasmidisolierung wurde der Transformant aus der Spur 9 des Gel 1 eingesetzt (Abschnitt 5.3.6) und wie unter Abschnitt 5.3.14 beschrieben sequenziert. Der generierte Vektor hat eine Größe von 7891 kb und wurde als pSEAP1-mSSRE bezeichnet.

6.5.3 Charakterisierung der hergestellten Promotortestplasmide durch Restriktionsanalyse

Die Längen der inserierten Promotor-Fragmente in den Vektor pSEAP1 wurden durch Hydrolyse der hergestellten Promotortestplasmide mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Abschnitt 5.3.9) bestimmt. Die Restriktionsansätze wurden gelelektrophoretisch in 1 %igen Agarosegelen getrennt (Abschnitt 5.3.8) und sind in den Abbildungen 6.40 bzw. 6.41 gezeigt. Das Gel in Abbildung 6.40 zeigt die Restriktionsanalyse der Vektoren pSEAP1-3,0kb, pSEAP1-mSSRE, pSEAP1-2,2 kb, pSEAP1-1,9kb, pSEAP1-1,8kb, pSEAP1-1,4kb und pSEAP1-0,9kb.

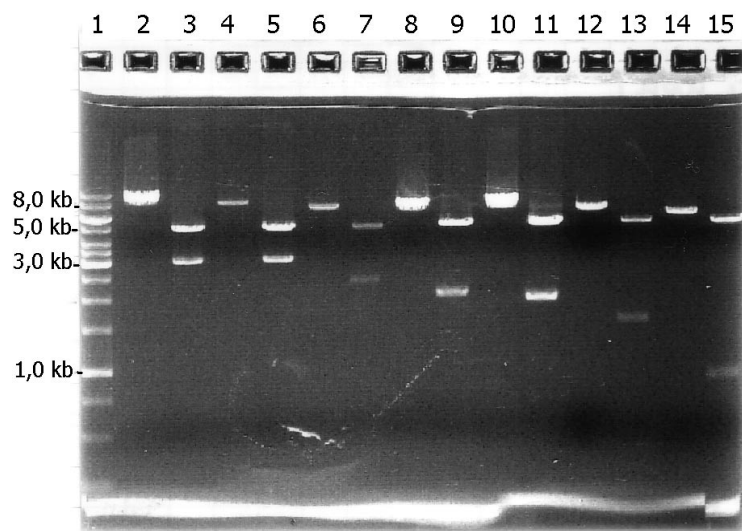


Abb. 6.40: 1 %iges Agarosegel der Restriktionsanalysen der unterschiedlichen Promotortestplasmide: Spur 1: 1 kb DNS-Leiter 1 (MBI), Spur 2: pSEAP1-3,0 kb mit KpnI hydrolysiert, Spur 3: pSEAP1-3,0kb mit KpnI/XhoI hydrolysiert, Spur 4: pSEAP1-mSSRE mit PvuI hydrolysiert, Spur 5: pSEAP1-mSSRE mit KpnI /XhoI hydrolysiert, Spur 6: pSEAP1-2,2kb mit KpnI hydrolysiert, Spur 7: pSEAP1-2,2kb mit KpnI /XhoI hydrolysiert, Spur 8: pSEAP1-1,9kb mit KpnI hydrolysiert, Spur 9: pSEAP1-1,9 kb mit KpnI/EcoRI hydrolysiert, Spur 10: pSEAP1-1,8kb mit KpnI hydrolysiert, Spur 11: pSEAP1-1,8kb mit KpnI/EcoRI hydrolysiert, Spur 12: pSEAP1-1,4 kb mit KpnI hydrolysiert, Spur 13: pSEAP1-1,4 kb mit KpnI/XhoI hydrolysiert, Spur 14: pSEAP1-0,8 kb mit KpnI hydrolysiert, Spur 15: pSEAP1-0,8 kb mit KpnI/XhoI hydrolysiert.

Alle generierten Promotortestplasmide zeigten nach Hydrolyse mit den entsprechenden Enzymen Fragmente der erwarteten Größe.

Das 1 %ige Agarosegel in der Abbildung 6.41 zeigt die Restriktionsanalyse des Vektors pSEAP1-2,6kb.

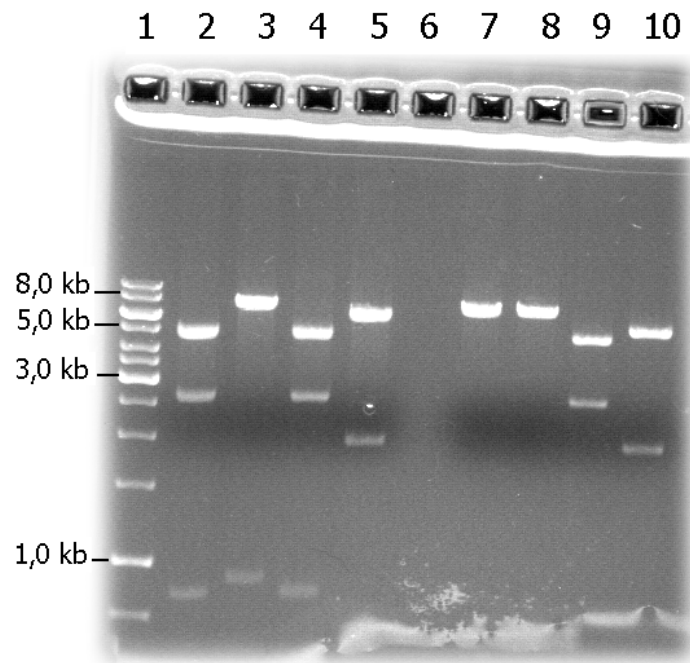


Abb. 6.41: 1 %iges Agarosegel der Restriktionsanalyse des Vektors pSEAP1-2,6 kb. Spur 1: 1 kb DNS-Leiter 1 (MBI), Spur 2: Plasmid 1 mit KpnI hydrolysiert, Spur 3: Plasmid 1 mit XhoI hydrolysiert, Spur 4: Plasmid 1 mit KpnI/XhoI hydrolysiert, Spur 5: Plasmid 1 mit AgeI hydrolysiert, Spur 6: frei, Spur 7 Plasmid 2 mit KpnI hydrolysiert, Spur 8: Plasmid 2 mit XhoI hydrolysiert, Spur 9: Plasmid 2 mit KpnI/XhoI hydrolysiert, Spur 10: Plasmid 2 mit AgeI hydrolysiert.

Nur das Plasmid 2 zeigte Fragmente der erwarteten Größe und wurde zur Sequenzierung wie unter Abschnitt 5.3.14 beschrieben eingesetzt.

6.5.4 Charakterisierung der hergestellten Promotortestplasmide durch Sequenzierung

Die inserierten Promotor-Fragmente der Vektoren pSEAP1-3,0kb, pSEAP1-2,6kb, pSEAP1-2,2kb, pSEAP1-1,8kb, pSEAP1-1,4kb, pSEAP1-0,9kb und pSEAP1-mSSRE wurden durch PCR amplifiziert. Um auszuschließen, dass durch die PCR Mutationen eingeführt wurden, wurden die in den Vektor pSEAP1 inserierten Promotorfragmente vollständig sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte entsprechend den Angaben unter Abschnitt 5.3.14. Verwendet wurden die in die PCR eingesetzten Forward- und Reverse-Primer. Zur vollständigen Sequenzierung wurden außerdem die folgenden Primer verwendet (Abschnitt 4.12):

pSEAP1-3,0kb: F-Tsp-1Prom700, F-Tsp-1-1,9kb, F-Tsp-1-Ubr

pSEAP1-mSSRE: F-Tsp-1Prom700, F-Tsp-1-1,9kb, F-Tsp-1-Ubr

pSEAP1-2,6kb: F-Tsp-1Prom700, F-Tsp-1-1,9kb, F-Tsp-1-Ubr

pSEAP1-2,2kb: F-Tsp-1Prom700, FTsp-1-1,9kb, F-Tsp-1-Ubr

pSEAP1-1,8kb: F-Tsp1-Ubr

pSEAP1-1,4kb: F-Tsp-1Prom700

Durch die Sequenzierung konnte die eingebrachte Mutation des SSRE bestätigt werden (Abbildung 6.42).

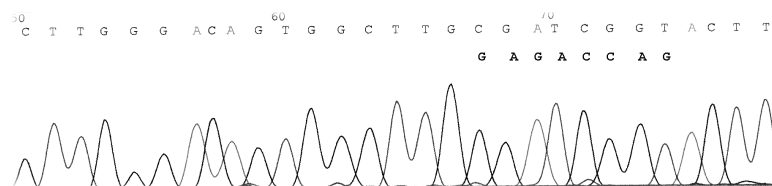


Abb. 6.42: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung des Vektors pSEAP1-mSSRE von der Position –1141 bis –1113. Die Sequenz GAGACCAG konnte erfolgreich zur Sequenz CGATCGGT mutiert werden.

6.5.5 Transfektion der hergestellten Promotortestplasmide in Säugerzelllinien

Zur Identifizierung regulatorischer, cis-aktiver Elemente, die für die scherstressabhängige Expression des Tsp-1-Gens verantwortlich sein könnten, wurden die unter Abschnitt 6.5.2 generierten Promotortestplasmide in eine Säugerzelllinie transfiziert. Zur Untersuchung der scherstressabhängigen Genexpression von Tsp-1 wären Endothezellen wie HUVEC oder BAEC die optimalen Wirtszellen. Diese sind jedoch Primärzellen, so dass keine stabilen Expressionszelllinien mit den unterschiedlichen Promotortestplasmiden generiert werden können. Transiente Transfektionen in HUVEC und BAEC zeigten, dass die Transfektionseffizienz zu niedrig war, um eine zuverlässige Messung der SEAP-Reporterogenaktivität zu erhalten. In vorangegangenen Studien im Arbeitskreis (Graf, Dissertation 2001) konnte gezeigt werden, dass nicht nur Endothelzellen sondern auch Fibroblasten sensitiv auf Scherstress reagieren, so dass die Transfektionsversuche an der immortalen und leicht zu transfizierenden Nierenfibroblastenzelllinie BHK-21 durchgeführt wurden. Zunächst wurden die BHK-21 Zellen stabil mit den unterschiedlichen Promotortestplasmiden transfiziert. Durch Inkubation der transfizierten Zellen unter Selektionsdruck mit G-418 konnten nach ca. 3 Wochen Zellen erhalten werden, die die unterschiedlichen Promotortestplasmide in ihr Genom integriert hatten. Zunächst wurden Messungen der Reporterogenaktivität an statisch kultivierten Zellen durchgeführt, um die unterschiedlichen Expressionsstärken der jeweiligen Promotortestplasmide zu ermitteln. Im Anschluss wurden die Messungen der Reporterogenaktivität an dynamisch kultivierten Zellen durchgeführt und diese mit der jeweiligen statischen Expression verglichen. Zeigte sich hier ein Unterschied in der Expressionsstärke zur statischen Kontrolle, so sollte in der entsprechenden Promotor-Region ein cis-aktives Element zur scherstressabhängigen Regulation vorhanden sein.

Zum Einbringen von DNS in Säugerzellen stehen eine Vielzahl an Transfektionsreagenzien zur Verfügung. Für die Transfektionen in BHK-21 wurde das Transfektionsreagenz Metafectene (Biontex) verwendet. Metafectene ist ein polykationisches Lipid, dessen molekulare Struktur ein leichtes Eindringen der DNS in die Zelle gewährleistet, indem die DNS zu kompakten Strukturen kondensiert wird. Die Aufnahme erfolgt über Endozytose. Im Endosom wird die Lipidmembran, die die DNS bedeckt, durch elektrostatische

Wechselwirkungen im leicht sauren Milieu der Endosomen destabilisiert und die DNS freigesetzt.

In allen Versuchen wurden zur Aussaat vitale Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase eingesetzt. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit einer Aussaatdichte von 5×10^4 Zellen/cm² ausgesät. Der eigentliche DNS-Transfer erfolgte einen Tag nach der Aussaat, so dass die Zellen bei der Transfektion 70-80 % konfluent waren. Durch Variation der eingesetzten DNS-Menge und deren Verhältnis zum Transfektionsreagenz wurden die optimalen Transfektionsbedingungen ermittelt. Für die Transfektion verwendete Plasmid-DNS wurde durch Anionenaustauschchromatographie wie unter Abschnitt 5.3.6 beschrieben isoliert und gereinigt.

Die Aktivitäten der einzelnen Promotorkonstrukte wurde durch die Expression des Gens der Sezernierten Alkalischen Phosphatase bestimmt. Die einzelnen Promotorfragmente waren in den Reportergenvektor pSEAP1 stromaufwärts des SEAP-Gens inseriert. Diesem Reportergenvektor fehlten Promotor- und Enhancersequenzen, so dass die Expression des SEAP-Gens mit der Transkriptionsaktivität der vorgeschalteten Promotorbereiche korrelierte. Um die Effekte der Promotordeletionen auf die Genexpression zu standardisieren, wurden stabil transfizierte Zelllinien hergestellt und die Expression des Reportergens auf die eingesetzte Zellzahl normiert.

6.5.5.1 Optimierung der Transfektionsbedingungen

Zur Optimierung der Transfektionseffizienz von BHK-21 Zellen mit Metafectene wurden in einer 24-Lochplatte 5×10^4 Zellen/cm² ausgesät und 24 h unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Zur Transfektion wurde der Vektor pEGFP-N1 eingesetzt (Abschnitt 4.14.3). Dieser trägt eine rotverschobene Variante des Wildtyp GFP-Reportergens hinter dem CMV-Promotor. Es wurden unterschiedliche DNS-Mengen und 3 unterschiedliche DNS zu Metafectene Verhältnisse untersucht. Diese sind in der folgenden Tabelle 6.6 dargestellt.

Tab. 6.6: Eingesetzte DNS- und Metafectene-Mengen zur Transfektionsoptimierung in BHK-21.
MF = Metafectene.

DNS:Metafectene	1:2	1:5	1:7
0,1 µg DNS	0,2 µl MF	0,5 MF	0,7 µl MF
0,5 µg DNS	1,0 µl MF	2,5 µl MF	3,5 µl MF
1,0 µg DNS	2,0 µl MF	5,0 µl MF	7,0 µl MF

Die Transfektion erfolgte wie unter Abschnitt 5.2.14 beschrieben. 24 h nach der Transfektion wurde die 24-Lochplatte bei einer Wellenlänge von 485 nm und 530 nm gemessen. Die Fluoreszenzintensitäten wurden gegen die eingesetzte DNS Menge und das DNS zu Metafectene-Verhältnis aufgetragen (Abbildung 6.43).

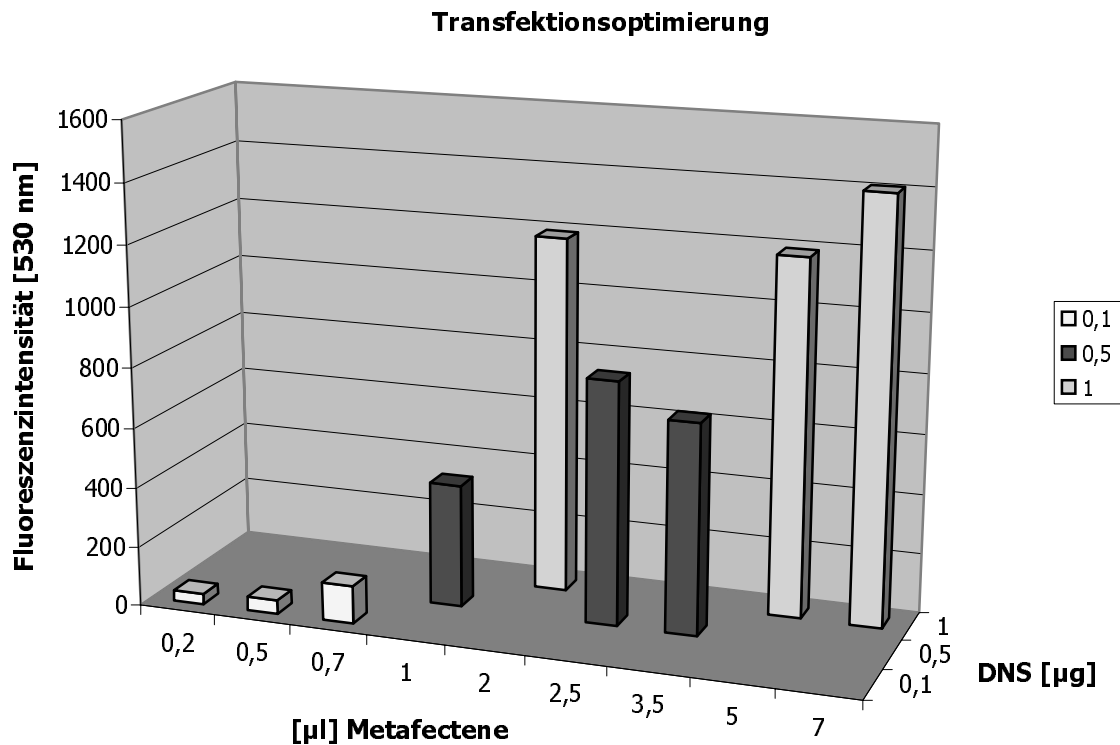


Abb. 6.43: Ergebnis der Transfektionsoptimierung von BHK-21 Zellen mit dem Transfektionsreagenz Metafectene.

Die höchste Transfektionsrate konnte bei einem Verhältnis von 1:7 mit 1 µg eingesetzter Plasmid-DNS erhalten werden. Da bei den Verhältnissen 1:2 und 1:5 unwesentlich geringere Transfektionseffizienzen erzielt wurden, der Reagenzverbrauch aber deutlich geringer war, wurden im Weiteren in einer 24-Lochplatte 1 µg DNS mit 2 µl Metafectene eingesetzt. Zur

Transfektion in größeren Kulturschalen wurde die DNS-Menge entsprechend der Kulturfläche angepasst, das DNS zu Metafectene-Verhältnis aber beibehalten.

6.5.5.2 Bestimmung der Genetecin-418-Toleranzdosis

Die Selektion transfizierter BHK-21 Zellen wurde vorgenommen, damit zur Untersuchung der Regulation des Tsp-1 Promotors eine möglichst hohe Zellzahl zur Verfügung stand, die das SEAP-Reportergen exprimiert. Stabil transfizierte Zellen sind resistent gegenüber dem Antibiotikum Genetecin-418, da alle hergestellten Promotortestplasmide das Gen der Aminoglycosid-Phosphotransferase (APH) tragen. Nichttransfizierte Zellen oder solche, die das Plasmid nicht in ihr Genom integriert haben, sterben ab. Zunächst wurde diejenige G418-Konzentration ermittelt, die zur Selektion der BHK-21 Zellen optimal war. Eine zu geringe Konzentration würde nicht zum Absterben untransfizierter Zellen führen. Eine zu hohe Konzentration würde Zellen eliminieren, ohne dass eine Integration des Vektors in das Genom stattgefunden hat. In 3 x 96-Lochplatten wurden 15 000 Zellen/cm² ausgesät und 24 h nach der Aussaat mit den unter Abschnitt 5.2.14.2 beschriebenen Konzentrationen G-418 (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000 und 1500 µg/ml) versetzt. Die Kultivierung erfolgte unter normalen Kulturbedingungen. Alle 2 bis 3 Tage wurde das Kulturmedium gewechselt. Nach 4, 8 und 14 Tagen wurde die Vitalität der Zellen mittels Calcein-AM wie unter Abschnitt 5.2.14.2 beschrieben bestimmt. In der Abbildung 6.44 sind die Toleranz-Dosis-Kurven der Tage 4 und 14 dargestellt.

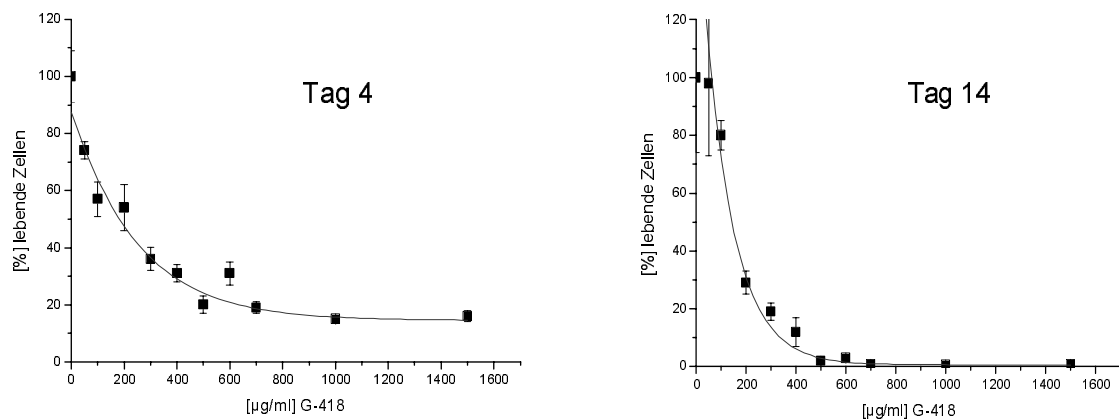


Abb. 6.44: Ergebnis des Toleranz-Dosis-Tests der BHK-21 mit dem Antibiotikum G-418. Nach 4tägiger Kultivierungszeit waren bis zu einer Konzentration von 1500 µg/ml G-418 ca. 20 % der Zellen vital. Nach 14tägiger Kultivierung waren ab einer Konzentration von 700 µg/ml alle Zellen abgestorben.

Nach 4tägiger Kultivierung mit G-418 waren bis zu einer Konzentration von 1500 µg/ml ca. 20 % der BHK-21-Zellen vital. Nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen waren ab einer G-418-Konzentration von 700 µg/ml alle Zellen abgestorben. 700 µg/ml G-418 reichten demnach aus alle Zellen abzutöten, die das Plasmid nicht in ihr Genom integrieren hatten. Zur späteren Selektion der transfizierten BHK-21 Zellen wurden 700 µg/ml G-418 verwendet.

6.5.5.3 Stabile Transfektion der Promotortestplasmide in BHK-21

Zur stabilen Transfektion mit den unterschiedlichen Promotortestplasmiden wurden BHK-21 Zellen mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/cm² in 6-Lochplatten ausgesät, für 24 h unter normalen Kulturbedingungen inkubiert und wie, unter Abschnitt 5.2.14.2 beschrieben mit den unter Abschnitt 6.5.6.1 optimierten Bedingungen transfiziert: pro Kavität mit 5 µg DNS und 10 µl Metafectene. Die transfizierten Zellen wurden für 48 h unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium unter Zusatz von 700 µg/ml G-418 gewechselt. Nach 24 h Kultivierung mit G-418-haltigem Medium wurde jede Kavität in eine 25-cm²-Flasche passagiert (s.r. 1: 3) und unter Selektionsdruck kultiviert. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden die transfizierten BHK-21-Zelllinien bei Erreichen der Konfluenz mit einer Teilungsrate von 1:10 passagiert. Anschließend wurde die Teilungsrate auf 1:20 erhöht. Zur Kontrolle der Transfektion wurden die Kulturüberstände der stabil transfizierten Zelllinien wie unter Abschnitt 5.2.15 beschrieben im SEAP-Test

eingesetzt. In der Tab 6.7 sind die zur Transfektion eingesetzten Plasmide und ihre Konzentrationen und Reinheitsgrade aufgeführt.

Tab. 6.7: Zur Transfektion eingesetzte Plasmide mit Konzentration, Reinheitsgrad und Größe.

Plasmid	Konzentration	Reinheit	Größe
pSEAP1	637 ng/μl	1,8	5,0 kb
pSEAP-N1	304 ng/μl	1,9	5,5 kb
pSEAP1-3,0kb	306 ng/μl	1,9	8,0 kb
pSEAP1-mSSRE	437 ng/μl	1,9	8,0 kb
pSEAP1-1,9 kb	257 ng/μl	1,9	6,9 kb
pSEAP1-1,8kb	351 ng/μl	1,9	6,8 kb
pSEAP1-1,4kb	587 ng/μl	1,9	6,4 kb
pSEAP1-0,9kb	564 ng/μl	1,9	5,9 kb
pSEAP1-2,6kb	561 ng/μl	1,9	7,6 kb
pSEAP1-2,2kb	607 ng/μl	1,9	7,2 kb

Der Vektor pSEAP1 enthält keinen Promotor und wurde als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Der Vektor pSEAP-N1 enthielt die SEAP hinter dem starken, konstitutiven CMV-Promotor und diente als Positiv-Kontrolle.

6.5.6 Bestimmung der Reportergenaktivität der unterschiedlichen Promotortestplasmide

6.5.6.1 Etablierung des SEAP-Reporter-Tests

Zur Bestimmung der SEAP-Aktivität wurden die Kulturüberstände der transfizierten BHK-21-Zellen entnommen und entweder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt wie unter Abschnitt 5.2.15 beschrieben zum Test eingesetzt. Die Normierung der Werte erfolgte über die Gesamtzellzahl. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen, wie unter Abschnitt 5.2.15.2 beschrieben, lysiert und die DNS mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt. Die Zellzahl wurde mittels Fluoreszenzmessung mit der Anregungswellenlänge 355 und der Emissionswellenlänge 460 nm quantifiziert.

a) Ermittlung des linearen Messbereichs

Zur Bestimmung des linearen Messbereichs des Fluoreszenzmessgerätes wurde eine Verdünnungsreihe mit Alkalischer Phosphatase von 22,5 Einheiten bis 10^{-6} Einheiten eingesetzt. Verwendet wurde die Alkalische Phosphatase Grad I aus Kälberdarm (Roche). Zur Herstellung der Verdünnungen wurde 2 x SEAP-Test Puffer und eine 96-Lochplatte verwendet (Abschnitt 5.2.15.3). Die Verdünnungsreihe wurde 30 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und auf Raumtemperatur äquilibriert. Jede Kavität wurde mit 100 μl 1 x SEAP-Test Puffer mit 3 μM MUP-Substrat versetzt und 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit der Anregungswellenlänge 355 und der Emissionswellenlänge 460 nm gemessen. Der lineare Messbereich erstreckte sich von 1 bis 15 mE eingesetzter Alkalischer Phosphatase (Abbildung 6.45).

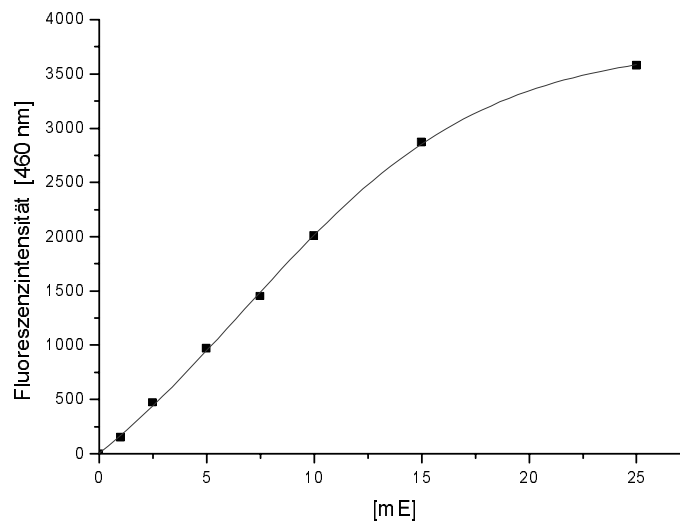


Abb. 6.45: Ermittlung des linearen Messbereiches der Alkalischen Phosphatase im Fluoreszenzmessgerät.

b) Berechnung der relativen SEAP-Aktivität

Die gemessenen SEAP-Aktivitäten der einzelnen Promotortestplasmide in parallelen Ansätzen, wurden nach Abzug der Grundaktivität, die sich aus dem Kulturüberstand des stabil transfizierten Plasmids pSEAP1 ergab, gemittelt. Die Normierung der Werte erfolgte über die durch DAPI bestimmte Gesamtzellzahl in den jeweiligen Kavitäten. Die SEAP-Aktivitäten der einzelnen Promotortestplasmide wurden dann auf die Aktivität des Wildtyp-Promotors (pSEAP1-3,0kb = 100 %) bezogen, wodurch sich der Wert für die relative SEAP-Aktivität (rel. SEAP-Aktivität [%]) ergab.

6.5.6.2 Bestimmung der Reporterogenaktivität der unterschiedlichen Promotortestplasmide unter statischen Kulturbedingungen

Zur Bestimmung der Reporterogenaktivitäten der einzelnen Promotortestplasmide wurden die generierten (Abschnitt 6.5.6.3) stabilen BHK-21 Zelllinien verwendet. Als Negativ-Kontrolle diente die Zelllinie BHK-21-pSEAP1. Diese wurde durch Transfektion mit dem Plasmid pSEAP1 erhalten, das keine Promotorsequenzen trägt und somit die basale Expression der SEAP zeigt. Als Positiv-Kontrolle wurde die stabile Zelllinie BHK-21-pSEAP-N1 verwendet. Diese enthält das Plasmid pSEAP-N1, das das SEAP-Reporterogen unter der Kontrolle des CMV-Promotors konstitutiv exprimiert. Die stabil transfizierten BHK-21 Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/cm² in die Kavitäten einer 24-Lochplatte ausgesät und bis drei Tage nach Erreichen der Konfluenz unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Pro Zelllinie wurden 3fach Bestimmungen durchgeführt. 24 h nach dem letzten Mediumwechsel wurden die Kulturüberstände entnommen und wie unter Abschnitt 5.2.15.1 beschrieben im SEAP-Test eingesetzt. Der Zellrasen wurde einmal mit PBS gewaschen, wie unter Abschnitt 5.2.15.2 beschrieben lysiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt. Die gemessenen SEAP-Aktivitäten wurden über die Zellzahl normiert, gemittelt und die relativen SEAP-Aktivitäten wie unter Abschnitt 6.5.6.1.3 beschrieben berechnet. Die Promotoraktivitäten der einzelnen Testplasmide sind in Abbildung 6.46 dargestellt. Die relative SEAP-Aktivität des Wildtyps pSEAP1-3,0kb wurde 100 % gesetzt.

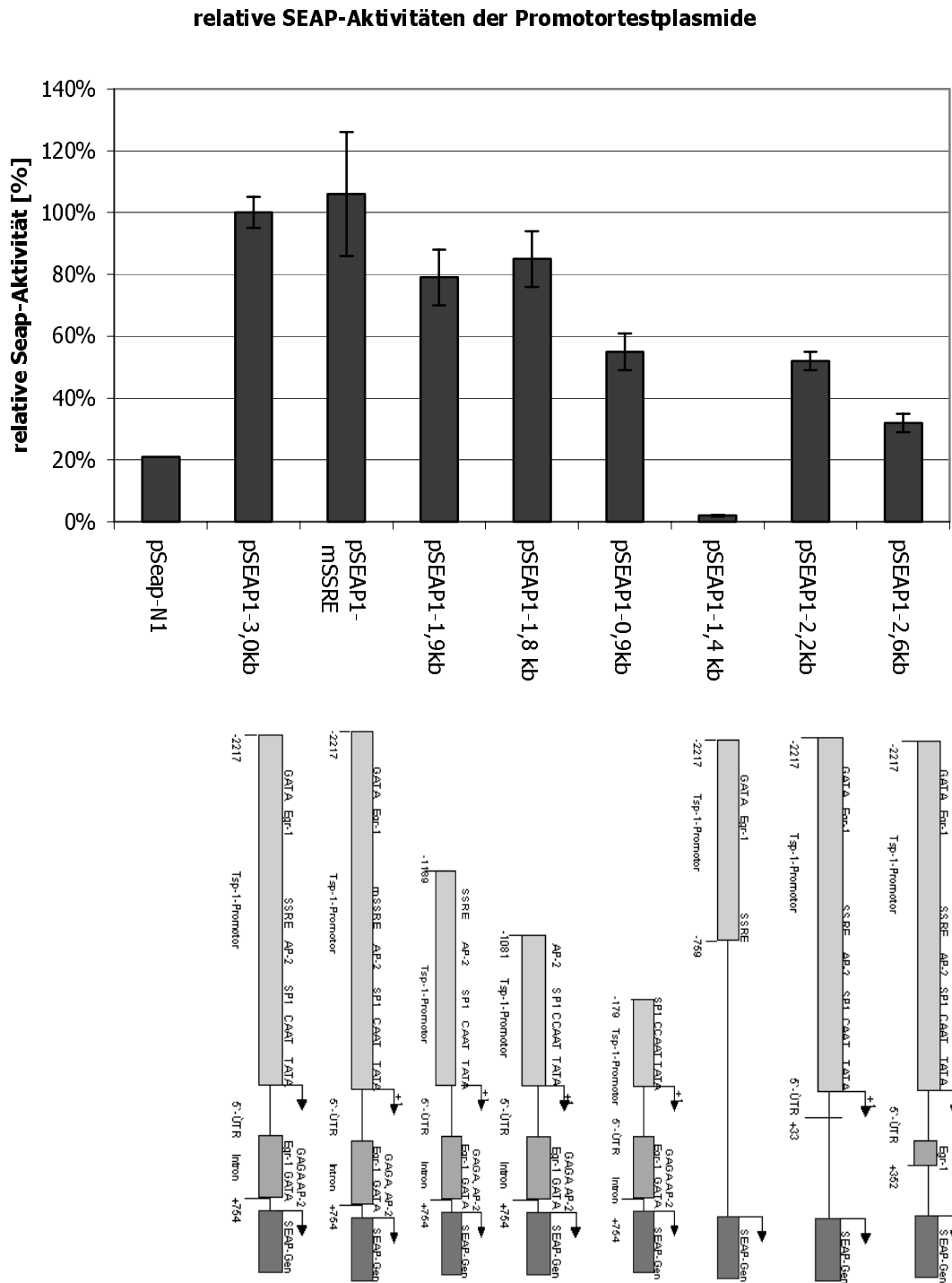


Abb. 6.46: Relative SEAP-Aktivitäten der unterschiedlichen Promotortestplasmide. Die Aktivität des pSEAP1-3,0kb wurden 100 % gesetzt.

Die prozentuale Änderung der relativen SEAP-Aktivität der einzelnen Promotortestplasmide gegenüber dem Wildtyp-Promotor sind in der Tabelle 6.8 zusammengefasst. Signifikante Aktivitätsänderungen ergaben sich zwischen den Sequenzbereichen der Promotortest-

plasmide pSEAP1-0,9kb, pSEAP1-2,2kb pSEAP1-2,6kb und pSEAP1-1,4kb und dem Wildtyp Promotor.

Tab. 6.8: Die prozentualen Änderungen der relativen SEAP-Aktivität der einzelnen Promotortestplasmide.

Promotortestplasmid	Änderung der relative SEAP-Aktivität gegenüber dem Wildtyp
pSEAP1-3,0kb	-
pSEAP1-mSSRE	(+) 6 %
pSEAP1-1,9kb	(-) 21 %
pSEAP1-1,8kb	(-) 15 %
pSEAP1-1,4kb	(-) 98 %
pSEAP1-0,9kb	(-) 45 %
pSEAP1-2,2kb	(-) 48 %
pSEAP1-2,6kb	(-) 68 %

6.5.6.3 Bestimmung der Reporterogenaktivität der unterschiedlichen Promotortestplasmide unter dynamischen Bedingungen

Zur Bestimmung der Reporterogenaktivitäten der einzelnen Promotortestplasmide unter dynamischen Bedingungen wurden die generierten (Abschnitt 6.5.6.3) stabilen BHK-21 Zelllinien verwendet. Als Negativ-Kontrolle diente die Zelllinie BHK-21-pSEAP1. Diese wurde mit dem Plasmid pSEAP1 erhalten, das keine Promotorsequenzen trägt. Somit konnte die basale Aktivität der SEAP bestimmt werden. Als Positiv-Kontrolle wurde die stabile Zelllinie BHK-21-pSEAP-N1 verwendet. Diese enthält das Plasmid pSEAP-N1, das das SEAP-Reporterogen unter der Kontrolle des CMV-Promotors konstitutiv exprimiert. Die stabil transfizierten BHK-21 Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/cm² in 94-mm-Schalen ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz statisch vorkultiviert. Drei Tage nach Erreichen der Konfluenz wurde eine der beiden Schalen wie unter Abschnitt 5.2.7 beschrieben in eine Plattenkegelapparatur eingebaut und für 24 h einem Scherstress von 10 dyn/cm² ausgesetzt. Die zweite Zellkulturschale wurde im gleichen Zeitraum statisch kultiviert und diente als Kontrolle. Nach 24 h wurde die Strömung abgebrochen, die Kulturüberstände entnommen und wie unter Abschnitt 5.2.15 beschrieben im SEAP-Test eingesetzt. Der Zellrasen wurde einmal mit PBS gewaschen, wie unter Abschnitt 5.2.15.2 beschrieben lysiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI zur Bestimmung der Zellzahl gefärbt. Die gemessenen SEAP-Reporterogenaktivitäten wurden über die ermittelte Zellzahl

normiert und die relativen SEAP-Aktivitäten wie unter Abschnitt 6.5.6.1.3 beschrieben berechnet. Die Werte der jeweiligen statischen Kontrolle wurden 100 % gesetzt. In der Abbildung 6.47 sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen dargestellt.

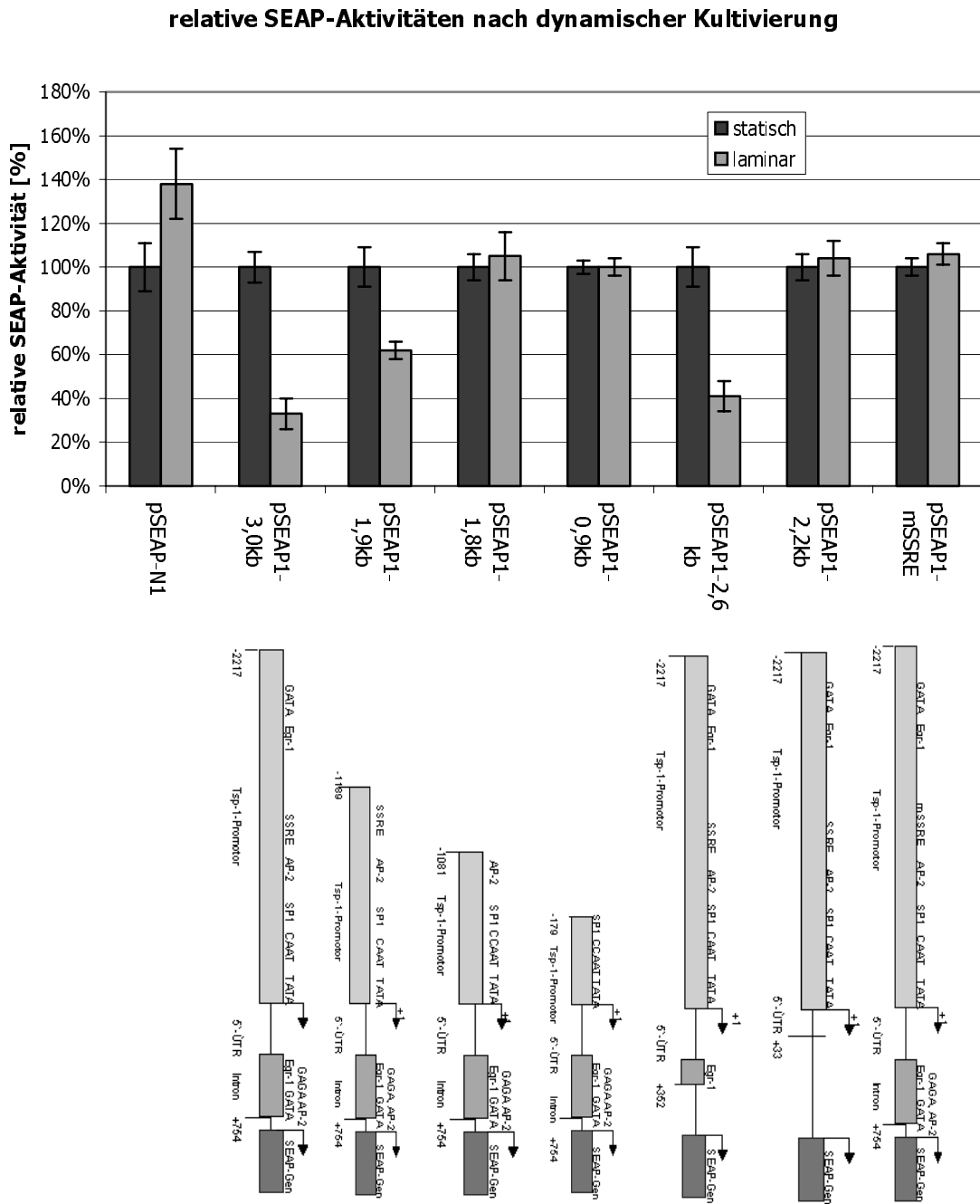


Abb. 6.47: Relative SEAP-Aktivitäten der unterschiedlichen Promotortestplasmide unter statischen und dynamischen Bedingungen. Die Aktivitäten der jeweiligen statischen Kontrollen wurden 100 % gesetzt.

Die prozentuale Änderung der relativen SEAP-Aktivitäten der einzelnen Promotortestplasmide gegenüber ihrer jeweiligen statischen Kontrolle sind in der Tabelle 6.9 zusammengefasst. Signifikante Aktivitätsänderungen ergaben sich zwischen den Sequenzbereichen der Promotortestplasmide pSEAP1-3,0kb und pSEAP1-2,6kb. Eine schwächere Aktivitätsänderung, im Bereich der Positiv-Kontrolle, ergab sich bei dem Promotortestplasmid pSEAP1-1,9kb.

Tab. 6.9: Die prozentualen Änderungen der relativen SEAP-Aktivität der einzelnen Promotortestplasmide bezogen auf ihre jeweilige statische Kontrolle.

Promotortestplasmid	Änderung der relativen SEAP-Aktivität gegenüber der statischen Kontrolle
pSeap-N1	(+) 38 %
pSEAP1-3,0kb	(-) 67 %
pSEAP1-1,9kb	(-) 38 %
pSEAP1-1,8kb	(+) 5 %
pSEAP1-0,9kb	(+/-) 0 %
pSEAP1-2,6kb	(-) 59 %
pSEAP1-2,2kb	(+) 4 %
pSEAP1-mSSRE	(+) 6 %

